

Rolle der cAMP-Zielsequenzen in der Regulation des humanen Reningens *in vitro* und *in vivo*

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
-BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN-
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von
Michael Desch aus Kirchham
im Jahr 2010

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von April 2006 bis Januar 2010 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Promotionsgesuch eingereicht am: 19.01.10

Mündliche Prüfung am: 10.03.10

Die Arbeit wurde angeleitet von: Herr Prof. Dr. Armin Kurtz

Prüfungskommission: Vorsitzender: Herr Prof. Dr. Frank Schweda

1. Prüfer: Herr Prof. Dr. Armin Kurtz

2. Prüfer: Herr Prof. Dr. Ralph Witzgall

3. Prüfer: Herr Prof. Dr. Jens Schlossmann

Ersatz: Herr Prof. Dr. Richard Warth

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
1.1 Das Renin-Angiotensin-System (RAS)	7
1.2 Syntheseort des Renins: die juxtaglomerulären Zellen	9
1.3 Das Reningen	11
1.4 Regulationen der Reninsynthese und Sekretion	13
1.4.1 Blutdruck	13
1.4.2 Salzhaushalt des Körpers	14
1.4.3 Sympathisches Nervensystem	15
1.4.4 Angiotensin II	16
1.4.5 Aldosteron	17
1.4.6 Humorale Faktoren	18
1.4.7 Zelluläre Regulation	18
1.4.7.1 Kalzium und Proteinkinase C	19
1.4.7.2 cAMP und Proteinkinase A	19
1.5 Transkriptionelle Regulation	22
1.5.1 Nichtkodierende DNA und Transkriptionsfaktoren	22
1.5.2 Der proximale Reninpromotor	23
1.5.2.1 Cis-agierende Elemente des proximalen Reninpromotors	23
1.5.2.2 cAMP-Ziel-Elemente des proximalen Reninpromotors	24
1.5.3 Der distale Renin Enhancer	25
1.5.3.1 Renaler Enhancer	25
1.5.3.2 Cis-wirkende Elemente des renalen Enhancers	26
1.5.3.3 Funktionen der cAMP-Zielsequenzen des humanen Reningens	26
1.6 Fragestellung	28
2 Material und Methoden	30
2.1 Material	30
2.1.1 Geräte	30
2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial	33
2.1.3 Antikörper	36
2.1.4 Primer	36
2.1.5 Medien, Puffer und Lösungen	39
2.1.5.1 Immunhistochemie	39
2.1.5.2 Molekularbiologie	40
2.1.6. Luziferase- und LacZ-Reporter-Konstrukte	42
2.1.7 Mikroorganismen und eukaryotische Zelllinien	44
2.1.7.1 Prokaryoten	44
2.1.7.2 Eukaryoten	44
2.1.8 Internetdienste und Software	44

2.2 Methoden	45
2.2.1 Versuchstiere	45
2.2.1.1 Generierung der hRenMutLacZ- und hRenMutLacZ AT _{1a} ^{-/-} -Mäuse	45
2.2.1.2 Genotypisierung	45
2.2.1.3 Gelelektrophorese	46
2.2.1.4 Tierversuche	47
2.2.3 Histologische Methoden	48
2.2.3.1 PFA-Fixierung und Präparation der Organe	48
2.2.3.1.1 PFA-Perfusionsfixierung der Organe adulter Mäuse	48
2.2.3.2 Herstellung von Gefrierschnitten für Immunhisto-chemische und X-Gal-Färbung	49
2.2.3.3 Histologischer Nachweis der β -Galaktosidase-Expression durch X-Gal-Färbung	49
2.2.3.4 Immunhistochemie	50
2.2.3.4.1 Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung	50
2.2.3.5 Mikroskopie und Bilddigitalisierung	51
2.2.3.5.1 Quantifizierung der LacZ-positiven Glomeruli	51
2.2.3.5.2 Dreidimensionale Rekonstruktion	52
2.2.4 Molekularbiologische Methoden	53
2.2.4.1 Kultivierung von Calu-6-Zellen	53
2.2.4.2 Lagerung der Zellen	53
2.2.4.3 Kultivierung von prokaryotischen Organismen	54
2.2.4.3.1 Anzucht von <i>E.coli</i> Bakterien	54
2.2.4.3.2 Erstellen einer <i>E.coli</i> Dauerkultur	54
2.2.4.4 Gerichteter Basenaustausch	54
2.2.4.5 Transformation	55
2.2.4.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	55
2.2.4.6.1 Mini-Präparation	56
2.2.4.6.2 Maxi-Präparation	56
2.2.4.7 DNA-Sequenzanalyse	57
2.2.4.8 Transfektion	57
2.2.4.8.1 Lipofektion	57
2.2.4.9 Inkubation der Calu-6-Zellen mit Aktivsubstanzen	58
2.2.4.10 Dual Luziferase Assay	58
2.2.4.11 β -Gal Reporter Gene Assay	59
2.2.4.12 RNA-Isolation	60
2.2.4.12.1 RNA-Isolation aus Calu-6-Zellen	60
2.2.4.12.2 RNA-Isolation aus Gewebe	60
2.2.4.13 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-konzentration	61
2.2.4.14 Reverse Transkription	61
2.2.4.15 Quantitative Polymerasekettenreaktion	62
2.2.4.16 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford-Test)	62
2.2.4.17 Statistik	63

3. Ergebnisse	64
3.1 <i>in vitro</i>	64
3.1.1 Rolle des proximalen CNRE-Elements	65
3.1.2 Rolle des proximalen CRE-Elements	67
3.1.3 Rolle des Enhancer CRE-Elements	72
3.1.4 Funktionelle Relevanz der enhCRE und CNRE Sequenzen in dem Kontext des 12.2 kb Humanreninpromotors	74
3.2 <i>in vivo</i>	77
3.2.1 Generierung einer transgenen Maus mit dem Transgen hRenMutLacZ	77
3.2.2 Co-Lokalisierung der Transgenexpression mit dem endogenem Renin in den JG Zellen der Niere	78
3.2.3 Expression des Transgens außerhalb der JG Zellen der Niere	84
3.2.4 Extrarenale Organe	87
3.2.5 Regulation der Transgenexpression in den JG Zellen <i>in vivo</i>	92
3.2.5.1 Beta-Adrenorezeptor Stimulation	92
3.2.5.2 Angiotensin II-gesteuerte Regulation des Transgens	93
3.2.5.3 Transgenexpression in AT _{1a} Knockout Mäusen	98
3.2.5.4 Regulation des Transgens durch Hochsalz- und Niedrigsalz-Diät	104
4. Diskussion	107
5. Zusammenfassung	121
6. Literaturverzeichnis	122
7. Anhang	138
7.1 Publikationen	138
7.2 Abbildungsverzeichnis	139
7.3 Abkürzungsverzeichnis	141
7.4 Danksagung	144

1 Einleitung

1.1 Das Renin-Angiotensin-System (RAS)

Renin wurde bereits im Jahr 1898 von Tigerstedt und Bergmann als blutdrucksteigernde Substanz entdeckt, indem sie den Effekt eines Nierenextraktes aus Kaninchen auf den arteriellen Blutdruck analysierten. Sie gaben der Substanz aufgrund ihres Ursprungsortes den Namen Renin. Ein weiterer Versuch der beiden, die Injektion von renalem Venenblut in nephrektomierte Tiere, zeigte eine Erhöhung des systemischen Blutdruckes. Es war aber zu dieser Zeit noch nicht bekannt, in welcher Weise Renin den Blutdruck erhöht. Die Arbeitsgruppen Goldblatt, Menéndez aus Buenos Aires und Page aus Indianapolis gaben erstmals in der Geschichte des Renins einen Einblick in die Wirkungsweise des Proteins. So zeigte Goldblatt 1934 an hypertensiven Hunden, dass der humorale Effektor des Renins das vasoaktive Protein Angiotensin ist, dessen Name den Bezeichnungen Hypertensin und Angiotonin entspringt (Basso und Terragno, 2001). Seitdem wurde das Renin-Angiotensin-System (RAS) stetig weiter erforscht, da es eine wesentliche Rolle bei der Regulation des Blutdruckes und des Wasser- und Salzhaushaltes des Körpers spielt.

Eine Erniedrigung des renalen Blutdruckes, wahrgenommen durch renale Barosensoren, führt zu einer erhöhten lokalen Reninausschüttung und somit zu einer Erhöhung der systemischen Plasma-Reninkonzentration. Dieses Protein Renin ist eine Aspartylprotease und wird aus den Epitheloidzellen des juxtaglomerulären Apparates (JG-Zellen) in das Blut des Vas afferens freigesetzt (vaskulärer Pol des Glomerulums). Das Substrat des Renins ist Angiotensinogen, welches in der Leber gebildet, ins Plasma sezerniert und dort durch Renin in das Decapeptid Angiotensin I gespalten wird. Angiotensin I selbst ist funktionell inaktiv, ist aber das Substrat für das hauptsächlich in der Lunge gebildete Enzym Angiotensin Converting Enzym (ACE) und wird durch dieses in das Octapeptid Angiotensin II (Ang II), durch Abspaltung eines Dipeptids am C-terminalen Ende, umgewandelt. Angiotensin II selbst ist der Haupteffektor des Systems. Ang II bindet die Rezeptoren AT₁ oder AT₂, wobei die Effekte der Bindung an den AT₁-Rezeptor bisher genauer untersucht wurden. Die Effekte von Ang II sind vielfältig. In den Gefäßen wirkt Ang II vasokonstriktorisch und damit blutdrucksteigernd. Im zentralen Nervensystem

erhöht es den NaCl-Appetit, löst ein Durstgefühl aus und bewirkt eine ADH (Antidiuretisches Hormon)-Freisetzung. Zusätzlich stimuliert es im Nebennierenmark die Freisetzung von Katecholaminen, wie Adrenalin und in der Nebennierenrinde die Synthese von Aldosteron. Aldosteron und Ang II führen schließlich zu einer verminderten Salz- und Wasserausscheidung aus der Niere, wodurch es zu einer Zunahme des Blutvolumens und zugleich zu einem höheren Gefäßwiderstand kommt, was folglich zu einem Wiederanstieg des Blutdruckes führt (Hackenthal et al., 1990).

Da das Renin an erster Stelle dieser Kaskade steht und dadurch die weiteren Schritte ausgelöst werden, ist unter physiologischen Bedingungen die Reninsekretionsrate der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Bildung von Angiotensin II. Weder die Konzentrationen von Angiotensinogen noch von ACE spielen hierbei eine entscheidende Rolle (Kurtz, 1989).

Hoher Blutdruck bzw. erhöhter renaler Perfusionsdruck, als auch erhöhte NaCl-Konzentration im Tubulus hemmen sowohl die Reninsynthese als auch die Reninsekretion. Ebenso übt Ang II einen negativen Effekt auf die Synthese und Sekretion von Renin aus und steuert dadurch das RAS über einen negativen Feedback-Mechanismus (Hackenthal et al., 1990).

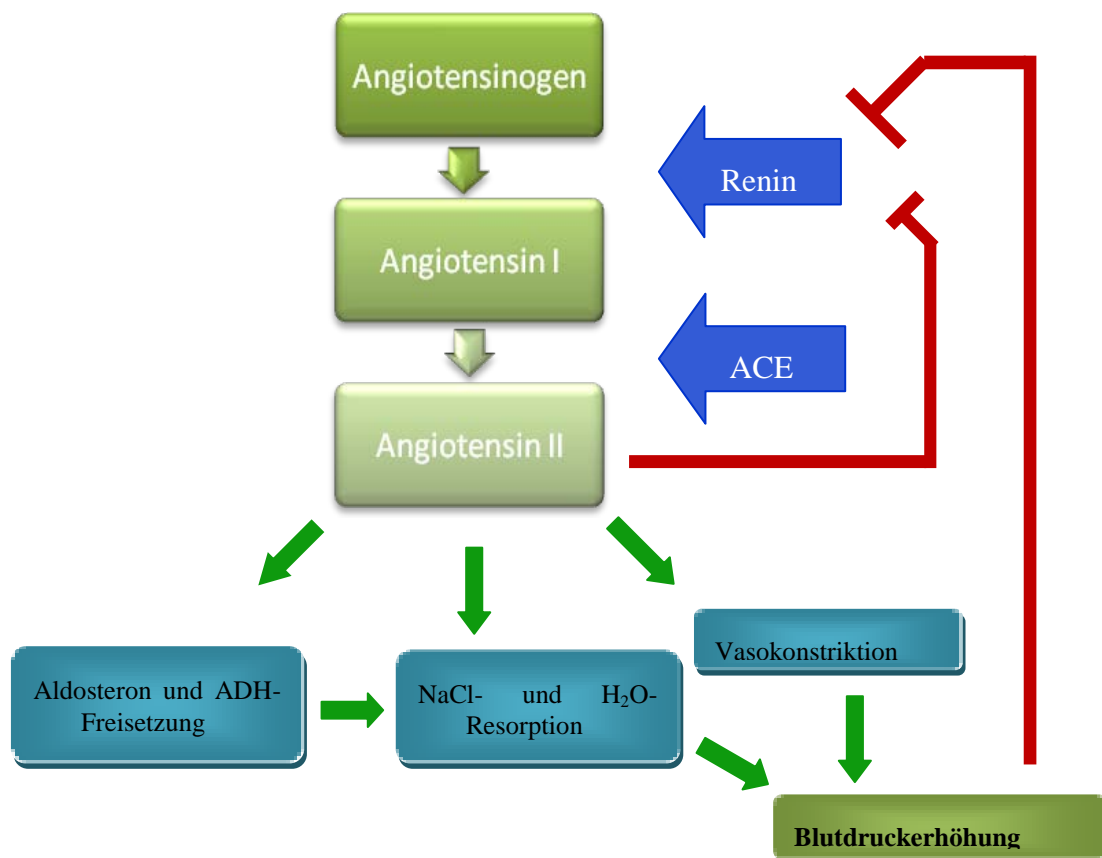


Abbildung 1.1: Die Signalkaskade des RAS

Renin wird als Teil lokaler Renin-Angiotensin-Systeme (RAS) in einer Vielzahl weiterer Organe und Gewebe gebildet. Dazu gehören u.a. Auge, Herz, Gehirn, Schilddrüse, Blutgefäße, Fortpflanzungsorgane sowie die Haut. Diese lokalen Reninsysteme vermitteln organspezifisch durch para- und autokrine Mechanismen die Wirkung (patho)-physiologischer Stimuli, modulieren die Effekte des Plasma-Renins auf Organebene und können zumindest unter bestimmten pathologischen Bedingungen (z. B. Fettgewebe-RAS bei Fettsucht) sogar zur Aktivierung des systemischen RAS beitragen (Paul et al., 2006; Bader und Ganter, 2008).

1.2 Syntheseort des Renins: die juxtaglomerulären Zellen

Der Hauptsyntheseort des Renins sind die juxtaglomerulären (JG)-Zellen in der Niere. Die funktionellen Einheiten der Niere sind die Nephronen, welche je aus einem Glomerulum und einem Tubulusapparat aufgebaut sind. Dieser Apparat umfasst den proximalen Tubulus, die Henle-Schleife sowie den distalen Tubulus. Am Gefäßpol wird das Blut über eine afferente Arteriole in das Glomerulum geleitet und verlässt dieses über eine efferente Arteriole. Die Glomeruli bilden dabei Filter, durch die der Primärharn filtriert wird. Während der Passage des Primärharns durch den Tubulusapparat wird der Urin gebildet und anschließend in das Sammelrohr geleitet (Abbildung 1.2).

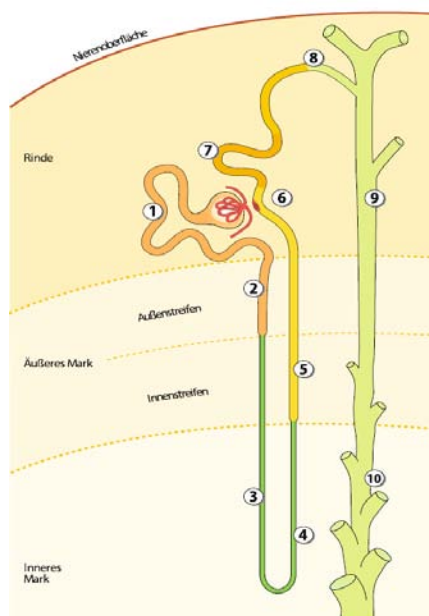


Abbildung 1.2: Schematische Übersicht eines Nephrons (Löffler, 2008):

1. Proximaler Tubulus, Pars convoluta
2. Proximaler Tubulus, Pars recta
3. Henle Schleife, Pars descendens
4. Henle Schleife, Pars ascendens
5. Distaler Tubulus, Pars recta
6. Macula Densa
7. Distaler Tubulus, Pars convoluta
8. Verbindungsstück
9. Sammelrohr
10. Calix

Die JG-Zellen befinden sich in den Gefäßwänden der afferenten Arteriole der einzelnen Glomeruli und stehen in Kontakt mit den Macula Densa Zellen, die im Epithel am Übergang der Pars recta zur Pars convoluta des distalen Tubulus sitzen. Zusammen mit den JG-Zellen werden die Macula Densa Zellen und das epitheliale Mesenchym als juxtaglomerulärer Apparat bezeichnet (Abbildung 1.3).

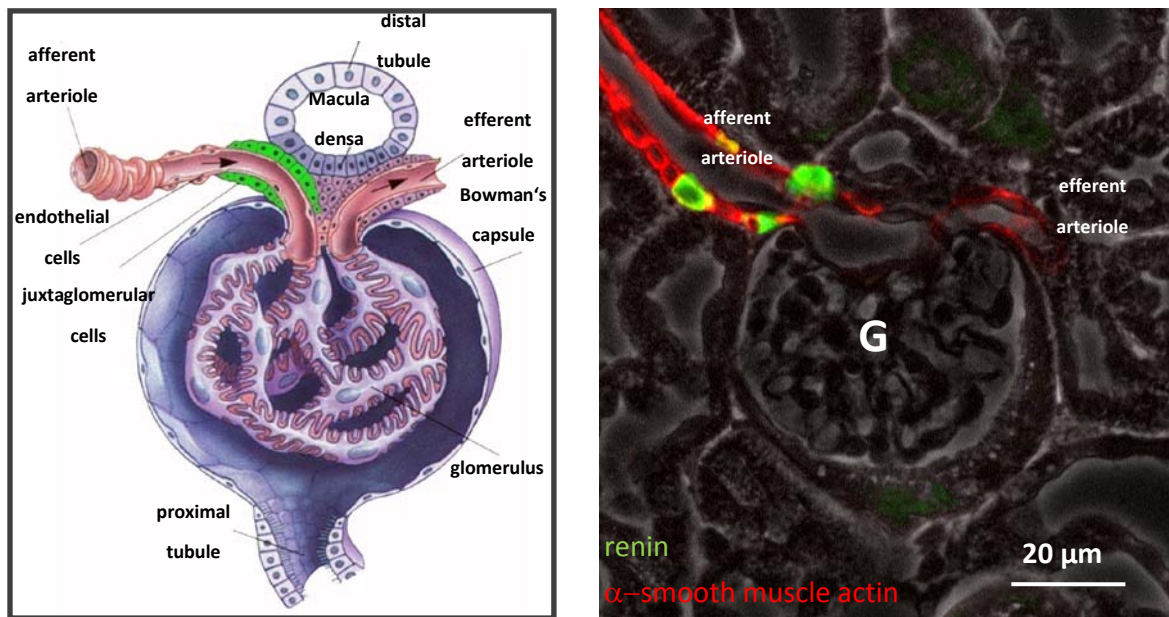


Abbildung 1.3: Schematische (links) und immunhistologische Darstellung eines Glomerulums. In der Wand der afferenten Arteriole liegen die juxtaglomerulären Zellen (links aus Junqueira et al., 2002).

Aufgrund der Befunde von Taugner et al. (1984) und Barajas (1979) wurde für lange Zeit angenommen, dass sich die JG-Zellen durch reversible metaplastische Transformation aus Gefäßmuskelzellen der afferenten Arteriole entwickeln. Bei diesem Prozess werden einerseits granuläre reninhaltige Vesikel unterschiedlicher Größe und Form gebildet, während sich andererseits die Myofibrillen zurückbilden. Dieser Annahme stehen aber neuere Befunde gegenüber. Diese zeigen, dass die JG-Zellen weniger differenziert sind als glatte Gefäßmuskelzellen. Demnach entwickeln sich beide Zelltypen aus den gleichen Vorläuferzellen, den Mesenchymzellen des Metanephrons (Sequeira Lopez et al., 2001). Die Anzahl der Renin-bildenden Zellen ist nicht konstant, sie sinkt mit zunehmendem Alter und unterliegt je nach Reninbedarf rapiden Schwankungen. So wandeln sich bei chronischer Stimulation des Reninsystems glatte Muskelzellen der afferenten Arteriole in Renin-produzierende Zellen um. Umgekehrt erfolgt bei einer chronischen Unterdrückung

des Reninsystems eine Umbildung der Renin-produzierenden Zellen zu glatten Muskelzellen (Kurtz, 1989; Sequeira Lopez et al., 2004).

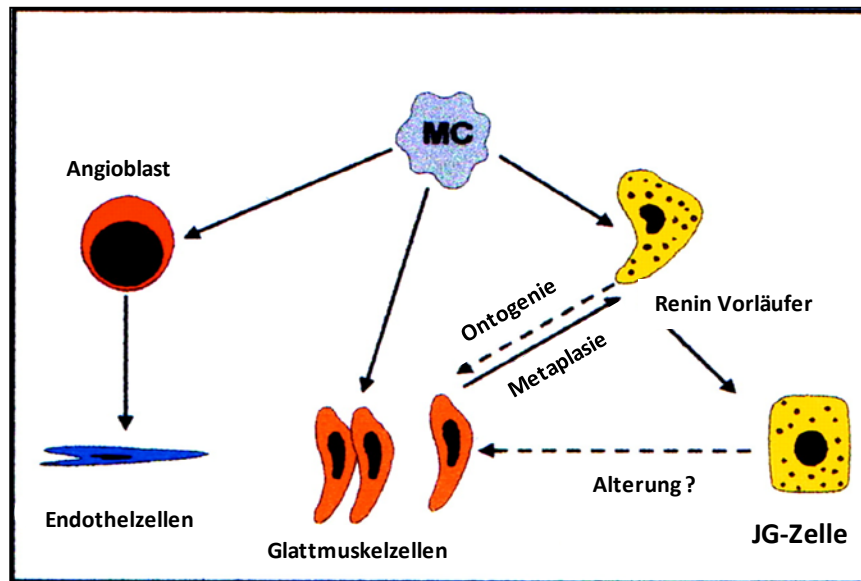


Abbildung 1.4: Differenzierung der JG-Zellen. Methanephrotische Mesenchymalzellen (MC) sind die Vorläufer der Angioblasten, aus denen Endothelzellen differenzieren. Ebenso gehen Glattmuskelzellen und Reninvorläuferzellen aus MC-Zellen hervor. Während der Ontogenese können sich Reninvorläuferzellen in eine Subpopulation von Glattmuskelzellen oder in JG-Zellen umwandeln. Diese Glattmuskelzellen können sich wiederum durch metaplastische Verformung in reninproduzierende Zellen umwandeln (aus Sequeira Lopez et al., 2001).

1.3 Das Reningen

Die Struktur des Reningens (*Ren*) wurde schon für viele verschiedene Spezies aufgeklärt, wie z.B. Schaf, Ratte, Maus und Mensch (Aldred et al., 1992; Burnham et al., 1987; Fukamizu et al., 1988; Hardman et al., 1984; Hobart et al., 1984; Panthier et al., 1982). Die Analyse der einzelnen Sequenzen zeigte eine große Homologie in den strukturellen Elementen der Gene. Das Reningen von Maus und Ratte besteht aus 9 Exons und 8 Introns, wohingegen Schaf und Mensch ein zusätzliches Exon (Exon 5a), kodierend für 3 Aminosäuren, im Reningen besitzen. Das Gen befindet sich auf Chromosom 1.

In der Forschung werden Mäuse von verschiedenen Inzuchtstämmen verwendet, wobei manche Stämme ein Reningen besitzen (*Ren-1C*) und manche zwei Reningene (*Ren-1D* und *Ren-2*) (Abel und Gross, 1988; Andersen et al., 2002). Diese beiden Reningene sind

fast gleich aufgebaut, weswegen man annimmt, dass sie durch eine Genduplikation vor mehr als 3 mio Jahre, entstanden sind (Dickinson et al., 1985; Holm et al., 1984). Der funktionelle Effekt dieser Genduplikation ist nicht bekannt. Man nahm lange Zeit an, dass Mäuse mit zwei Reningen einen höheren Plasmapreninspiegel haben, wogegen aber die Tatsache sprach, dass diese Mäuse einen normalen Blutdruck haben (Bing et al., 1979; Meneton et al., 2000). Eine neuere Studie zeigte, dass Mäuse mit einem Reningen die gleiche Plasmapreninkonzentration aufweisen wie Mäuse mit zwei Reningen (Hansen et al., 2004).

Nachdem das Reningen transkribiert wurde, wird das translatierte Preprorenin in das endoplasmatische Retikulum durch Abspaltung des Signalpeptides transloziert, wobei das enzymatisch inaktive Prorenin entsteht (Hackenthal et al., 1990; Morris, 1992; Morris 1996; Tamura et al., 1995). Prorenin wird anschließend über Vesikel in den Golgi Apparat transportiert. Dort wird entweder der konstitutiv sekretorische Weg eingeschlagen oder das Prorenin wird glykosiliert, ein Mannose-6-Phosphatrest (M6P) angehängt und in lysosomenähnliche sekretorische Vesikel verpackt. Das *Ren-2* Produkt hat keine Glykosilierungsstellen und wird somit nur konstitutiv sezerniert, woraus man schließt, dass die Glykosilierungsstellen wichtig für die Ausbildung der sekretorischen Reninvesikel sind, nicht aber für das Verpacken des Renins in diese (Clark und Sharp et al., 1997). Eine N-terminale Verkürzung des Prorenins um 42 AS in den Vesikeln führt zur Bildung des aktiven Renins. Dieses wird nicht kontinuierlich, sondern in Portionen, durch Verschmelzung der Reningranula mit der Zellwand der JG-Zelle sezerniert (Taugner, et al., 1984; Skott, 1986).

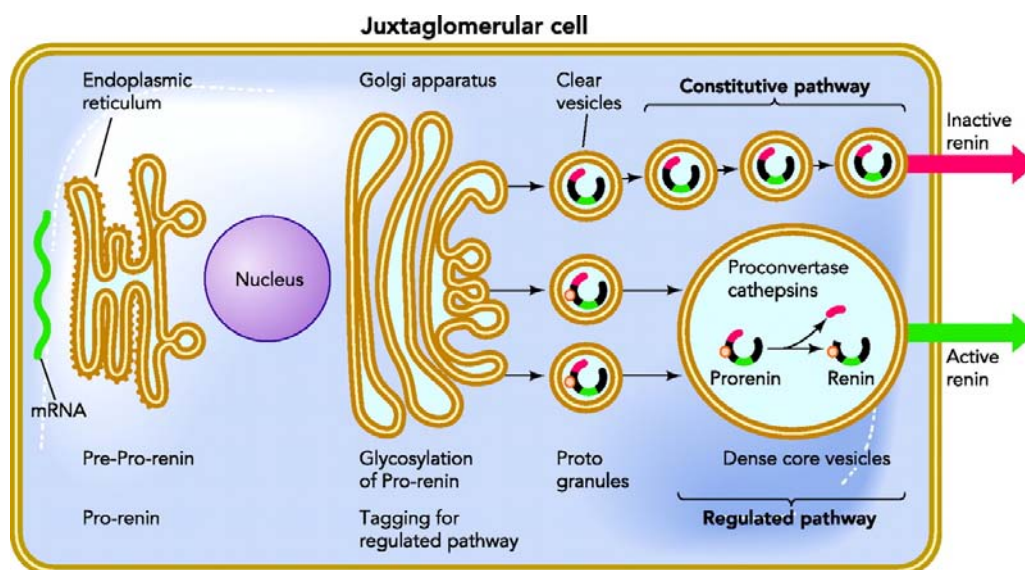


Abbildung 1.5: Schematische Übersicht der Prozessierung des Renins (aus Schweda et al., 2007).

1.4 Regulationen der Reninsynthese und Sekretion

Plasma RAS spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes und des Blutdruckes eines Organismus. Die einzelnen Variablen dieses Systems regulieren in Form eines negativen Feedbacks die Expression und Sekretion des Renins. Ausserdem werden die Reninexpression und die Sekretion vom sympathischen Nervensystem, tubulären Mechanismen, renalen Autacoiden und Hormonen beeinflusst.

1.4.1 Blutdruck

Reninsekretion und Synthese werden vom renalen Perfusionsdruck beeinflusst. Sinkt der systemische Blutdruck, so wird auch der renale Perfusionsdruck reduziert, was wiederum einen Anstieg der Reninsynthese und der Sekretion bewirkt. Eine Erhöhung des systemischen Blutdruckes bewirkt das Gegenteil (Nafz et al., 1997; Skinner, 1964). Da dieser druckabhängige Effekt auch noch bei der isoliert perfundierten Niere auftritt, wird angenommen, dass der dafür verantwortliche Drucksensor in der Niere selbst lokalisiert ist (Scholz et al., 1994). Es wird angenommen, dass bei erhöhtem Blutdruck die intrazelluläre Kalziumkonzentration der glatten Muskelzellen des juxtaglomerulären Apparates ansteigt und eine Kontraktion auslöst. Die Kontraktion selbst bewirkt eine Dehnung der JG-Zellen, welche dann vom Rezeptor wahrgenommen wird (Bader u. Ganten, 2000; Carey et al., 1997). Versuche an isolierten JG-Zellen (Fray, 1984) und einer JG-Zelllinie (Ryan et al., 2000) bestätigen eine verminderte Reninexpression und Reninsekretion bei mechanischer Dehnung.

1.4.2 Salzhaushalt des Körpers

Die Salzaufnahme ist ein wichtiger Faktor bei der Regulation des RAS, da eine gesteigerte Kochsalzaufnahme zu einer Hemmung und eine verminderte Kochsalzaufnahme zu einer Steigerung der Renin-Synthese und Freisetzung führt (Wagner und Kurtz, 1998).

Es wird angenommen, dass die salzabhängigen Änderungen der Reninproduktion aus einzelnen verschiedenen Mechanismen resultieren wie z.B.: systemisch humorale Faktoren, intrarenale Faktoren, renale Nerven und intrarenale Macula Densa Mechanismen. Bis heute ist noch nicht genau bekannt, welche Faktoren oder Mechanismen die Änderungen der Reninexpression bei Änderungen der Salz-Diät auslösen.

Schon früh in der Geschichte des RAS wurde eine Beteiligung der Macula Densa bei der Regulation der Reninsekretion in JG-Zellen durch den Salzhaushalt bestätigt (Goormaghtigh et al., 1937; Vander et al., 1967). Zwei Aufgaben werden der Macula Densa dabei zugeschrieben: zum einen die Übermittlung des negativen Feedbacks zwischen dem Perfusionsdruck in der afferenten Arteriole und der glomerulären Filtrationsrate (TGF) und zum anderen die Verknüpfung der extrazellulären Natriumkonzentration mit der Reninsekretion (Briggs und Schnermann, 1986). Der genaue Signalweg zwischen Macula Densa und Renin-produzierenden Zellen konnte bis dato allerdings noch nicht eindeutig geklärt werden. Es wurde eine Abhängigkeit der Expression von Stickstoffmonoxid-Synthase I (NOS I) wie auch von Cyclooxygenase 2 (COX 2) in der Macula Densa von der Kochsalzkonzentration festgestellt (Harris et al., 1994; Mundel et al., 1992). Andere Arbeiten zeigen einen Zusammenhang zwischen der in der Macula Densa gebildeten COX 2 und dem Reninsystem (Schnermann, 2001; Harris, 2003). Jüngere Studien an Knockout Mäusen zeigen aber, dass zwar NO generell für den Ablauf der Macula Densa gesteuerten Reninsekretion wichtig ist, dessen Bildung aber unabhängig von der NOS I der Macula Densa zu sein scheint (Castrop et al., 2004). Ähnliche Studien mit Ratten, die jeweils eine funktionsfähige, filtrierende und eine nicht filtrierende Niere besitzen, zeigen eine parallele Regulation der Renin und der COX 2 mRNA in beiden Nieren nach Hochsalz- und Niedrigsalz-Diäten oder Furosemidbehandlung. Diese Daten zeigen, dass eine glomeruläre Filtration für eine Hochregulation der COX 2- und Reninexpression nicht zwingend notwendig ist und daher die Rolle der Macula Densa im bisher angenommenen physiologischen Regulationsmechanismus in Frage zu stellen ist (Schweda et al., 2004).

1.4.3 Sympathisches Nervensystem

Es ist bekannt, dass das sympathische Nervensystem die Reninsekretion über einen β -adrenergen Signalweg beeinflusst (Hackenthal et al., 1990). Die Präsenz von β -adrenergen Rezeptoren auf JG-Zellen wurde durch viele Rezeptor Bindestudien und in situ Hybridisierung nachgewiesen (Hackenthal et al., 1990). Ausserdem wurden β -adrenerge Rezeptoren auf JG-Zellen durch immunhistochemische Färbungen gezeigt (Boivin et al., 2001). Eine Aktivierung dieser Rezeptoren durch Katecholamine führt zu einer Aktivierung von Adenylatzyklasten, was zu einer Anreicherung von cAMP in den JG-Zellen führt. Dies resultiert in einer vermehrten Reninsynthese und Reninsekretion (Holmer et al., 1997; Kurtz, 1997). Jedoch werden dadurch nur JG-Zellen zur Reninsekretion angeregt (Wagner et al., 1999).

Pharmakologische Hemmung der β -adrenergen Rezeptoren resultiert in einer verminderten Reninsekretion (Castrop et al., 2004; Keeton et al., 1980). Ebenso führt renale Denervierung, ein Manöver zur Ausschaltung des sympathischen Inputs, zu einer verminderten Renin Genexpression (Golin et al., 2001; Holmer et al., 1994), wobei man beachten muss, dass dies auch die tubulären und hämodynamischen Effekte des sympathischen Nervensystems, ausgelöst durch α -Rezeptoren aufhebt (Hesse et al., 1985). Neuere Erkenntnisse über die Wichtigkeit des sympathischen Nervensystems bei der Regulation der Reninsekretion brachte eine β_1/β_2 -Adrenorezeptor Knockout Maus, welche im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle eine um 85% niedrigere Plasma Renin Konzentration (PRC) aufweist (Kim et al., 2007). Trotzdem zeigten andere Studien, dass eine Änderung der Aktivität des Reninsystems nur bedingt abhängig vom β -adrenergen Input ist. So zeigten Studien, dass sowohl eine renale Denervierung als auch eine pharmakologische Blockade der β -Adrenorezeptoren keinen deutlichen Einfluss auf die salzabhängige Regulation des Reninsystems haben (Golin et al., 2001, Holmer et al., 1993; Holmer et al., 1994). Andererseits zeigen Studien an Ratten, Hunden und Mäusen, dass der β -Adrenorezeptor Antagonist Propranolol die Höhe des durch Nidrigsalzdiät induzierten Stimulus reduziert (Keeton und Campbell 1980; Tkacs et al., 1990). Diese teilweise widersprüchlichen Ergebnisse resultieren aus Speziesunterschieden und den unterschiedlichen Versuchsansätzen. Allerdings muss auch beachtet werden, dass bei Versuchen mit unterschiedlichen β -Adrenorezeptor Antagonisten unklar bleibt, wie stark die jeweilige Hemmung ist. Die Generierung einer β_1/β_2 -Adrenorezeptor Knockout Maus

half, dieses Problem zu lösen (Kim et al., 2007). Wie schon erwähnt ist die basale Reninexpression und PRC in $\beta_1\beta_2^{-/-}$ Mäusen stark reduziert im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle. Eine Änderung der Reninsekretion, ausgelöst durch chronische Stimuli wie orale Salzaufnahme, Schleifendiuretika, ACE-Hemmer oder AT_1 -Rezeptor Antagonisten bleiben in $\beta_1\beta_2^{-/-}$ Mäusen aber erhalten. Allerdings ist hier die Höhe der Änderung merklich vermindert.

1.4.4 Angiotensin II

Zirkulierendes Angiotensin II (Ang II) inhibiert die Renin Synthese und die Sekretion über einen negativen Feedback Mechanismus (Hackenthal et al., 1990). Ausserdem bewirkt exogene Angiotensin II Applikation eine Hemmung der Synthese und Sekretion des Renins (Schunkert et al., 1992). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass eine Hemmung der Effekte von Ang II mit AT_1 -Rezeptor-Antagonisten oder ACE-Inhibitoren zu einem starken Anstieg der Synthese und Sekretion des Renins führt (Castrop et al., 2003; Höcherl et al., 2004). So haben z.B. auch AT_{1A} -Rezeptor Knockout Mäuse einen erhöhten Anteil von Renin-positiven JG-Zellen (Oliverio et al., 1998). Ob dieser Effekt auf das Reninsystem direkt oder indirekt ist, kann nicht eindeutig gesagt werden.

Angiotensin II selbst, die Deletion von AT_{1A} -Rezeptoren, genauso wie AT_1 -Rezeptor-Antagonisten und ACE-Inhibitoren haben einen Einfluss auf den Blutdruck, was somit einen indirekten Effekt von Ang II auf die Reninsynthese und Reninsekretion über den systemischen Blutdruck annehmen lässt. Ein weiterer Effekt von Ang II in einer Konzentration, niedriger als für die Ausübung systemisch hämodynamischer Effekte notwendig, ist die Erniedrigung der COX 2-Expression in Macula Densa Zellen (MD Zellen) (Zhang et al., 2003). Dies führt zu einer Suppression der COX 2-abhängigen Prostanoiden, was wiederum die Renin Synthese und Sekretion hemmt. Dafür spricht auch die Tatsache, dass geringe Dosen von Ang II, die noch keinen Effekt auf den Blutdruck haben, die Renin Sekretion hemmen (Davis und Freeman 1976, Hackenthal et al., 1990). Für einen direkten Effekt von Ang II sprechen Studien, in denen Ang II die Reninsekretion bei isoliert perfundierten Nieren und bei Nierenschnitten hemmt (Naftilan und Oparil, 1978; Vandogen et al., 1974). Auch das Vorhandensein von AT_1 -Rezeptoren auf JG-Zellen

lässt einen direkten Effekt vermuten, ebenso Studien in As4.1-Zellen, bei denen Ang II die Renin Synthese und Sekretion hemmt. (Burson et al, 1994; Müller et al., 2002).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass Ang II direkt über eine kurze negative Feedback Schleife und auch indirekt über z.B. Blutdruck und COX 2-Expression die Reninsynthese und Sekretion inhibiert.

1.4.5 Aldosteron

Die Stimulation der Renin Freisetzung erhöht das Plasma Ang II, was folglich die Sekretion von Aldosteron aus der Nebenniere stimuliert (Spat und Hunyady, 2004). Erhöhung des Plasma Ang II und des Plasma Aldosterons erhöht die Natrium Rückresorption und führt somit zu einer Steigerung des Natriumgehaltes im Organismus, was wiederum die Renin Genexpression hemmt (Hackenthal et al., 1990; Kurtz und Wagner 1999; Spat und Hunyady, 2004).

Kürzlich wurde gezeigt, dass sowohl JG-Zellen als auch As4.1-Zellen den Mineralocorticoid-Rezeptor (MR) exprimieren, und dass Aldosteron die Renin mRNA-Expression in primären JG-Zellkulturen der Maus, welche mit Isoproterenol vorstimuliert wurden, erhöht, keinen Einfluss aber auf die Exocytose von gespeichertem Renin hat (Klar et al., 2004). Im Gegensatz dazu haben MR- und Aldosteron-Synthase -defiziente Mäuse eine stark erhöhte Plasma Renin Konzentration, erklärbar durch Salzverlust aufgrund erhöhter Salzausscheidung (Berger et al., 2000; Makhanova et al., 2006).

Aus all den Befunden lässt sich einerseits schließen, dass Aldosteron einen direkten Effekt auf die Renin Genexpression auf zellulärer Ebene ausübt, indem es wahrscheinlich zu einer Stabilisierung der Renin mRNA kommt. Andererseits hat es einen indirekten systemischen Einfluss auf die Renin Expression und Sekretion durch Änderungen im Salzhaushalt des Körpers, Extrazellulärvolumen oder Blutdruck.

1.4.6 Humorale Faktoren

Neben den bisher beschriebenen Mechanismen, die zur Regulation der Reninsynthese beitragen, gibt es aber auch noch lokal synthetisierte Faktoren, die in direkter Nachbarschaft der JG-Zellen gebildet werden und andere Substanzen, die die Reninexpression beeinflussen. So üben Substanzen wie Adenosin, Vasopressin, Endothelin, Interleukin-1 β , Platelet activating factor (PAF), TGF- β II und Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) einen hemmenden Effekt auf die Synthese und Sekretion von Renin aus (Keeton und Campell, 1981; Pfeilschifter et al., 1985; Kurtz et al., 1988; Scholz et al., 1995; Petrovic et al., 1997; Todorov et al., 2002; Pietri et al., 2002), während Substanzen wie Bradykinin, Calcitonin Gene Related Peptide, Adrenomedullin, Stickstoffmonoxid und Prostaglandin die Synthese und Sekretion von Renin stimulieren (Keeton und Campell, 1981; Kurtz et al., 1988; Kurtz, 1989; Jensen et al., 1997).

1.4.7 Zelluläre Regulation

Die meisten Befunde über die zelluläre Regulation des Reningens und der darin involvierten Signaltransduktionswege stammen aus Zellkulturexperimenten. Es ist noch wenig über die Relevanz der *in vitro* gefundenen molekularen Mechanismen bei der *in vivo* Regulation des Reningens bekannt. Die bisherigen Daten deuten darauf hin, dass der cAMP/PKA Signalweg und der Calcium/PKC Signalweg unter physiologischen Gesichtspunkten die Renin Genexpression steuern, wohingegen wahrscheinlich der STAT Signalweg, NF κ B und Mitglieder der Nuklear-Rezeptor Superfamilie unter pathologischen Bedingungen die Expression des Renins steuern. Versuche mit in den genannten Signalwegen gentechnisch veränderten Tieren sollen in Zukunft neue Informationen über die *in vivo* Relevanz der Signalkaskaden liefern.

1.4.7.1 Kalzium und Proteinkinase C

Im Gegensatz zu der im nächsten Punkt erwähnten aktivierenden Funktion des cAMP/PKA-Signalweges auf die Renintranskription und Reninsekretion sind zytosolisches Kalzium und/oder die Proteinkinase C (PKC) an der Suppression der Reninexpression beteiligt (Della Bruna et al., 1995; Müller et al., 2002). Diese hemmende Funktion des Kalziums und dessen Effektors PKC in der Reninexpression wird auch das Kalzium-Paradoxon genannt. Paradoxon, weil ein Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration in der Regel die humorale Sekretion fördert. Hormone wie z.B. Angiotensin II und Endotheline inhibieren die Renin Gentranskription und Sekretion, indem sie die zytosolische Kalzium-Konzentration erhöhen bzw. die PKC aktivieren (Hackenthal et al., 1990; Kurtz et al., 1986; Müller et al., 2002; Ritthaler et al., 1995; Ritthaler et al., 1996). Man weiß aber bis dato immer noch nicht genau, wie Kalzium und die PKC die Renin Gentranskription hemmen. Vor kurzem wurde herausgefunden, dass Kalzium die humane Renin Gentranskription hemmt, indem es mit einem Kalzium Response Element in der Promotor-Region interagiert (Fuchs et al., 2003). Angiotensin II zielt auf das proximale 2,8 kb Element, wohingegen Endothelin den murinen *Ren-1C* Enhancer ansteuert (Le Fevre et al., 2003).

1.4.7.2 cAMP und Proteinkinase A

Der second messenger zyklisches AMP (cAMP) wird von den Adenylatzyklasten gebildet, welche wiederum durch extrazelluläre Stimuli über G-Protein gekoppelte Rezeptoren reguliert werden. cAMP selbst wirkt auf die Transkription durch Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) (Lalli et al., 1994). cAMP bindet an zwei regulatorische Untereinheiten und bewirkt dadurch ein Abspalten zweier katalytischer Untereinheiten vom inaktiven Tetramerkomplex PKA. Die freien katalytischen Untereinheiten (auch aktive PKA genannt) translozieren in den Nukleus und phosphorylieren die Transkriptionsfaktoren der cAMP response element binding protein/transcription factor family (CREB/ATF). Diese Transkriptionsfaktoren sind konstitutiv an die cAMP response elements (CRE) der regulatorischen Sequenzen der cAMP gesteuerten Gene gebunden und werden durch die PKA induzierte Phosphorylierung transaktiviert (Montminy, 1997).

CREB ist der prototypische Repräsentant der CREB/ATF Transkriptionsfaktor-Familie, die das cAMP Signal auf das Reningen vermitteln (Germain et al., 1996; Klar et al., 2002; Lalli et al., 1994; Pan et al., 2001; Ying et al., 1997). Es wurde gezeigt, dass CREB an die CRE Sequenz des distalen Enhancers und proximalen Promotors des Reningens bindet. CREM (cyclic AMP response modulator) und wahrscheinlich auch ATF, beide dem CREB strukturell sehr ähnlich, interagieren ebenso mit dem Enhancer CRE (Klar et al., 2002; Pan et al., 2001). Diese drei Transkriptionsfaktoren besitzen die gleiche konservierte Zielsequenz der PKA.

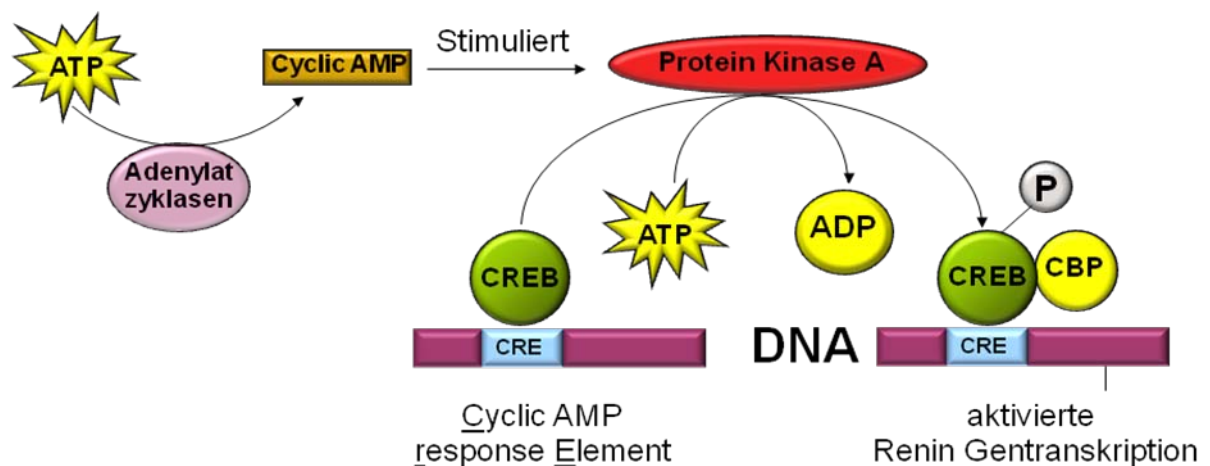


Abbildung 1.6: cAMP/PKA Signalkaskade des Reningens

Es wird angenommen, dass der cAMP Signalweg die zentrale stimulatorische Kaskade der Renin Gentranskription darstellt (Klar et al., 2002; Pan et al., 2001). cAMP vermittelt die Stimulation der Reninexpression durch Katecholamine/sympathische Aktivierung und Prostaglandine (Chen et al., 2007; Jensen et al., 1996; Kurtz, 1989). Ausserdem bestimmt die cAMP/PKA Kaskade die basale Transkriptionsrate des Reningens (Pan et al., 2001). Studien an transgenen Mäusen bestätigten eindeutig die zentrale Rolle des cAMP in der physiologischen Kontrolle der basalen Renin Genexpression. Chen et al. generierten eine Maus mit einer spezifischen Deletion des Gs- α -Proteins in den Renin-produzierenden Zellen (Chen et al., 2007). Gs- α ist eine wichtige Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins, welches die Bindung an die Rezeptoren IP, EP4, und den β -adrenergen Rezeptor auf die Adenylatzyklase übermittelt. Diese Rezeptoren übertragen somit die Effekte von

Prostazyklin, Prostaglandin E2 und Katecholaminen auf die Renin Expression (Friis et al., 2005; Keeton und Campbell, 1980).

Ein Knockout der Gs- α -Untereinheit in den Renin-produzierenden Zellen erniedrigt drastisch die renale Renin mRNA sowie die Plasma Renin Konzentration (PRC) (Chen et al., 2007). Eine G-Protein gekoppelte Induktion der Renin Genexpression wurde bei den JG-spezifischen Gs- α Knockout Tieren nicht getestet, was somit keinen Aufschluss über die Rolle des cAMP-Signalweges in der physiologischen Regulation des Reningens zulässt.

Die Bindung des nuklearen Faktors LXR α als Monomer an das proximale Renin-Promotorelement CNRE (cAMP and overlapping negative response element) kann ebenso durch cAMP moduliert werden, was einen Einfluss auf die Renin Genexpression hat (Horiuchi et al., 1991; Horiuchi et al., 1993; Tamura et al., 2000; Tamura et al., 2008). Es wird angenommen, dass die PKA LXR α an zwei potenziellen Stellen innerhalb der Ligand Bindedomäne (LBD) phosphoryliert (Kennelly und Krebs, 1991). Ausserdem wurde die C-terminale AF-2 Transaktivierungsdomäne des LXR α Moleküls als wichtiges Element in der Regulation durch cAMP bestimmt (Tamura et al., 2000). In LXR $\alpha^{-/-}$ Mäusen wird das Reningen nicht mehr durch adrenerge Stimulation beeinflusst (Morello et al., 2005), andererseits fand man heraus, dass die CNRE-Sequenz unwichtig für die Regulation des Reningens ist (Tanimoto et al., 2008). Diese teils widersprüchlichen Befunde legen die Vermutung nahe, dass die einzelnen CRE-Zielsequenzen redundant sind, was bedeutet, dass bei Ausfall eines Elements ein anderes Element den Effekt kompensiert.

1.5 Transkriptionelle Regulation

1.5.1 Nichtkodierende DNA und Transkriptionsfaktoren

Der ausschlaggebende Punkt für den Reichtum an verschiedenen Zelltypen liegt allein in der Kontrolle der Genexpression. Diese findet auf vielen Ebenen statt: bei der Transkription, der Prozessierung der mRNA und der Kontrolle ihrer Stabilität. Auf ein gebildetes Protein kann weiterhin durch Kontrolle seiner Aktivität und Lebensdauer Einfluss auf seine letztendliche Wirkung genommen werden.

Ein typisches eukaryotisches Gen besteht aus mehreren kodierenden Exons und dazwischen liegenden nicht kodierenden Introns. Stromaufwärts des Transkriptionsstarts (+1) befindet sich ein Abschnitt, der als Promotor bezeichnet wird. Diese Region enthält viele DNA Bindemotive, mit denen die allgemeinen Transkriptionsfaktoren und auch gen- oder zellspezifische Transkriptionsfaktoren wechselwirken können und zusammen mit der RNA Polymerase den Transkriptionsinitiationskomplex bilden. Der Bereich enthält viele Sequenzen, welche die Einleitung der Transkription steuern.

Eukaryotische Gene haben neben dem Promotor noch weitere regulatorische Elemente, welche als Enhancer bezeichnet werden. Die Definition eines Enhancers ist eine regulatorische DNA Sequenz, welche die Transkription in einer orientierungs- und positionsunabhängigen Weise stark induziert. Die Enhancer befinden sich meist mehrere Kilobasen (kb) vor oder hinter den Genen, aber auch auf den Introns innerhalb der Gene. Durch Schleifenbildung der DNA können Regulatorproteine, die an solche Abschnitte binden, mit Proteinen wechselwirken, die an den Promotor binden. Somit kann ein einzelner Promotor zusätzlich von mehreren regulatorischen Sequenzen entlang der DNA gesteuert werden.

1.5.2 Der proximale Reninpromotor

Als „proximaler Reninpromotor“ wurde zu Beginn der Untersuchungen am Reningen ein 123 bp Fragment von -117 bis +6 definiert (Petrovic et al., 1996). Dieses Stück wurde als unabdingbar für die maximale Zell-spezifische Expression des Reningens angesehen (Borensztein et al., 1994; Petrovic et al., 1996). Der proximale Promotor ist zwischen dem humanen, murinen und dem Ratten Reningen stark homolog und beinhaltet in allen drei Spezies eine perfekt konservierte TATA Box. Weiter stromaufwärts wird die Homologie durch eine etwa 500 bp große Insertion im murinen Reningen unterbrochen (Burt et al., 1989). Aufgrund neuer gefundener cis-regulatorischer Elemente wurde der proximale Reninpromotor auf bis über -200 bp upstream des Transkriptionsstartes verlängert und gegenwärtig in der Größe als solcher angesehen. Man sagt, dass die Transkriptionsfaktor-Bindestellen innerhalb dieses proximalen Promotors wichtig für die basale Aktivität des Reningens sind, ausserdem für die transkriptionelle Regulation durch zyklisches AMP (cAMP) und Kern-Rezeptoren und für die Kontrolle der Renin Gentranskription während der Ontogenese.

1.5.2.1 cis-agierende Elemente des proximalen Reninpromotors

Der proximale Reninpromotor besitzt viele Elemente, die wichtig für die Renin Gentranskription sind. So wird das humane Reningen durch den Kernrezeptor PPAR γ reguliert, welcher an die Pal3-Stelle bindet (Todorov et al., 2007). In Maus und Ratte ist diese Stelle still (Todorov et al., 2008). Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der an der Kontrolle der Renin Gentranskription beteiligt ist, ist der Kern-Rezeptor CBF1, welcher einen Partner der HOX/PBX Transkriptionsfaktoren darstellt (Pan et al., 2001; Pan et al., 2005). Weiterhin binden die Transkriptionsfaktoren NF1 und Sp1/Sp3 in einem Bereich von -197 bis -70 des murinen *Ren-1C* Gens (Pan et al., 2004).

1.5.2.2 cAMP-Ziel-Elemente des proximalen Reninpromotors

Viele Studien haben gezeigt, dass das Reningen durch zyklisches AMP (cAMP) reguliert wird. Die Anwesenheit eines funktionellen cAMP response elements (CRE) ist eine charakteristische Eigenschaft der Reninpromotoren aller untersuchten Spezies (Borensztein et al., 1994; Germain et al., 1997; Klar et al., 2002; Nakamura et al., 1989; Pan et al., 2001; Shi et al., 1999; Ying et al., 1997). Eine proximale Promotor CRE Sequenz befindet sich im humanen Reningen an der Stelle von -226 bis -219 (Ying et al., 1997). Da aber nur die 3'-Hälfte des Elements evolutionär konserviert ist, ist seine Rolle in der Regulation des Reningens umstritten. Es gibt reichlich Anzeichen dafür, dass einige CRE unabhängige proximale Promotor-Elemente in der cAMP-abhängigen Regulation des Reningens involviert sind. So ist eine Pit-1 Transkriptionsfaktor Bindestelle bei -77 bis -67 im humanen Reninpromotor wichtig für die Stimulation der Renin Gentranskription durch cAMP (Germain et al., 1996, Sun et al., 1993; Sun et al., 1994). Die dazu homologe Sequenz im Maus *Ren-1C* Gen bei -72 bis -50 ist ebenso wichtig für die transkriptionelle Aktivität. Dieses DNA-Motiv wird von den homeodomain-Proteinen HOX und PBX gebunden (Chang et al., 1996; Pan et al., 2005; Pan et al., 2001). Früher schon wurde postuliert, dass die HOX/PBX Bindestelle unverzichtbar für die basale Renin Genexpression in der Niere *in vivo* ist (Darnell et al., 1994, Moncada 1983).

Der nukleare Rezeptor LXR α ist ebenso in der cAMP-abhängigen Regulation des Reningens beteiligt, indem er das Signal auf ein CNRE (cAMP and overlapping negative response element) Motiv überträgt. CNRE befindet sich an der Position -128 bis -115 im humanen Reningen und an Position -611 bis -599 im murinen *Ren-1D* Gen (Horiuchi et al., 1991; Horiuchi et al., 1993; Tamura et al., 2000; Tamura et al., 2004). Diese Sequenz hat eine geringe Homologie zu einerseits CRE und andererseits dem klassischen DR4 LXR-response element (DR4/LXRE). Trotzdem hat partielle Deletion des proximalen Promotor LXR α Bindemotivs weder auf die basale Renin Genexpression noch auf die Regulation des Reningens *in vivo* einen Einfluss, was somit gegen eine physiologische Relevanz der CNRE-Stelle spricht (siehe auch 2.4.7.2) (Morello et al., 2005).

1.5.3 Der distale Renin Enhancer

Zusätzlich zum Promotor wird die Renin Genexpression auch von einem 5'-flankierenden Enhancer-Element reguliert.

1.5.3.1 Renaler Enhancer

Im Maus *Ren-1C* Gen wurde ein 242 bp großes Fragment an der Position von -2866 bis -2625 als Enhancer identifiziert. Es wurde gezeigt, dass diese Sequenz die Renin Gentranskription in der Renin-produzierenden Zelllinie As4.1 bis zu 100-fach erhöht (Petrovic et al., 1996). Da die As4.1 Zellen renalen Ursprungs sind, wird der *Ren-1C* Enhancer auch renaler oder kidney Enhancer genannt (Petrovic et al., 1996; Sigmund et al., 1990).

Der renale Enhancer existiert auch im humanen Reninpromotor, hier aber in einer Position, die viel weiter stromaufwärts gelegen ist (~ -12 kb) (Yan et al., 1997). Der humane und der murine kidney Enhancer sind in ihren distalen 202 bp stark homolog, während sie in ihren proximalen 40 bp nur eine 45 % Übereinstimmung haben. Diese geringen 45 % sind der Grund für die niedrige Transaktivierungskapazität des humanen Enhancers im Vergleich zum murinen (Itani et al., 2007).

Die Rolle des renalen Enhancers in der Regulation der Renin Genexpression *in vivo* ist bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt. Studien an transgenen Mäusen, die das humane Reningen auf einem künstlichen Chromosom tragen, zeigten, dass der Enhancer des humanen Reningens für die Stimulation des Renin Genexpression durch ACE-Inhibition entbehrlich ist (Zhou et al., 2006). Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass eine Deletion des endogenen renalen Enhancers in Mäusen zu einem Stillstand der Regulation des Reningens durch die Kombination Natriumchlorid und ACE-Inhibitor führt (Adams et al., 2006; Markus et al., 2007). Beide, sowohl muriner als auch humaner renaler Enhancer scheinen aber *in vitro* und *in vivo* wichtig für die basale Transkription des Reningens zu sein (Adams et al., 2006; Zhou et al., 2006).

1.5.3.2 Cis-wirkende Elemente des renalen Enhancers

Zwei sich direkt wiederholende TGACCT Sequenzen liegen stromabwärts direkt neben einer E-Box, welche mit USF1/USF2 interagiert (Itani et al., 2007; Shi et al., 2001). Dieses sich wiederholende Hexamer repräsentiert die DNA Bindedomäne der Kernrezeptor-Superfamilie und wird hormone responsive element (HRE) genannt. Übereinstimmend wurde gezeigt, dass die nuklearen Kernrezeptoren retinoic acid receptor/retinoid X receptor (RAR/RXR), peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) und der orphan Rezeptor Ear2 an dieses Enhancer Element binden und die Transkription des Reningens stimulieren (Liu et al., 2003; Shi et al., 2001; Todorov et al., 2008). Im murinen kidney Enhancer überlappt das stromabwärtsgelegene TGACCT Motiv mit einer NF-Y Transkriptionsfaktor Bindestelle (Shi et al., 1999; Shi et al., 2001), weshalb man annimmt, dass die Bindung von NF-Y eine Bindung von Transkriptionsregulatoren an das Hexamer unmöglich macht und somit die aktivierende Eigenschaft des Enhancers hemmt (Shi et al., 2001).

Es gibt noch weitere sieben Transkriptionsfaktor Bindestellen im distal gelegenen Teil des renalen Enhancers. Zum einen den Wilms' Tumor Suppressor (WT1), der die Renin Gentranskription hemmt (Steege et al., 2008). An die anderen sechs Motive binden die NFI und Sp1/Sp3 Transkriptionsregulatoren, welche auch, wie schon erwähnt, an den proximalen Promotor binden (Pan et al., 2003; Pan et al., 2004).

Der stromabwärts gelegene Teil des renalen Enhancers beinhaltet weiterhin eine CRE-Stelle, welche CREB/CREM bindet und davon proximal gelegen die schon genannte E-Box, die mit USF1/USF2 interagiert (Klar et al., 2002, Pan et al., 2001).

1.5.3.3 Funktionen der cAMP-Zielsequenzen des humanen Reningens

Wie schon erwähnt ist das humane Reningen im Besitz von mehreren cAMP-Zielsequenzen. Unter anderem das cAMP response element (CRE) im distalen renalen Enhancer, ein CRE-Element im proximalen Promotor und ein cAMP and overlapping negative response element (CNRE) ebenfalls im proximalen Promotor. Über diese cAMP-Zielsequenzen und deren angebliche Wichtigkeit bei der Stimulation der Renin

Gentranskription wurden teilweise widersprüchliche Ergebnisse beschrieben, was zu keiner eindeutigen Aufklärung der Renin Gentranskription durch den cAMP/PKA Signalweg führt.

So zeigt einerseits eine Studie über das CNRE-Element, dass der Transkriptionsfaktor LXR α nach Phosphorylierung durch die durch cAMP aktivierte Proteinkinase A an die CNRE-Stelle bindet und eine LXR α -Agonisten-Applikation eine Erhöhung der Renin Abundanz bewirkt (Morello et al., 2005), andererseits zeigt eine *in vivo* Studie über transgene Mäuse, bei der die murine CNRE-Stelle mutiert wurde, keine Änderung in der Renin Gentranskription im Vergleich zu Kontrollmäusen (Tanimoto et al., 2008). Das proximale CRE-Element scheint entscheidend für die Aktivierung des Reninpromotors durch Forskolin *in vitro* zu sein (Ying et al., 1997), *in vivo* ist über diese Stelle aber noch nichts bekannt. Über die Enhancer CRE-Stelle weiß man, dass *in vivo* eine Deletion des kompletten humanen Enhancers keinen Einfluss auf die Stimulation der Renin Genexpression hat (Zhou et al., 2006), wohingegen Markus et al. (2007) und Adams et al. (2006) berichten, dass der murine Enhancer wichtig für diese Art der Regulation der Renin Genexpression ist. Ausserdem zeigen unabhängige Studien, dass eine Deletion des murinen Enhancer CRE-Elements zu einer Reduktion der Aktivität eines Reportergens führt, welches unter dem Einfluss des partiell deletierten Reninpromotors steht (Pan et al., 2001; Klar et al., 2002). Bisher wurden aber noch keine *in vitro* oder *in vivo* Studien durchgeführt, die nur das humane Enhancer CRE-Element betreffen.

Somit kann man, wie schon einmal erwähnt, aufgrund der teils widersprüchlichen Befunde vermuten, dass die einzelnen CRE-Zielsequenzen redundant sind, was bedeutet, dass bei Ausfall eines Elements, ein anderes Element den Effekt kompensiert, was dann zu den widersprüchlichen Ergebnissen, wie beschrieben führt.

1.6 Fragestellung

Die Transkription des Reningens wird durch verschiedene cis-wirkende Elemente des proximalen Reninpromotors und des distalen renalen Enhancers beeinflusst. Demgegenüber stehen unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, welche die Signale für die Hemmung oder die Stimulation vermitteln. Einer der *in vitro* am detailliertesten untersuchte Signalweg, der die Renin Gentranskription steuert, ist der cAMP/PKA Signaltransduktionsweg. *In vitro* Studien führten zu der Identifizierung von drei cAMP-Zielsequenzen im Reningen, dem renalen Enhancer CRE-Element, dem Proximal Promotor CRE-Element und dem Proximal Promotor CNRE-Element. Die *in vivo* Studien über die einzelnen cAMP-Zielsequenzen oder einzelne Mitglieder der cAMP-Signalkaskade erbrachten widersprüchliche Ergebnisse. Ziel dieser Arbeit war es daher, aufgrund all dieser Vorbefunde, die Funktionalität dieser cAMP-Zielsequenzen in einem humanen Reninpromotor aufzuklären. Die Entschlüsselung der Regulation des humanen Reninpromotors ist von großer Bedeutung, da eine erhöhte Reninexpression und Sekretion mit kardiovaskulären Krankheiten, wie Bluthochdruck und Herzinsuffizienz und Nierenkrankheiten verbunden sein kann. Es ist bereits bekannt, dass der proximale 12,2 kb Humanreninpromotor, der den renalen Enhancer und den proximalen Promotor beinhaltet, für die zell- und entwicklungsspezifische Reninexpression ausreichend ist (Fuchs et al., 2002; Castrop et al., 2006). Deswegen sollen zunächst funktionsfähige cAMP Zielsequenzen in dem 12.2 kb Humanreninpromotor *in vitro* identifiziert werden. Anschließend sollen die identifizierten cAMP-Zielsequenzen in einem Humanreninpromotor-Reportergenkonstrukt funktionslos mutiert werden. Mit diesem Konstrukt soll eine transgene Maus generiert werden, welches das Reportergen LacZ unter der Kontrolle des mutierten humanen Reninpromotor-Fragments exprimiert. Immunhistochemische und mRNA Analyse Methoden sollen Aufschluss über den Ort der Expression des Reportergens geben. Endogen exprimierte Renin soll dabei als Positiv-Kontrolle dienen. Änderungen in der endogenen Reningenexpression sollen Aufschluss über die etwaige funktionelle Relevanz der mutierten cAMP-Zielsequenzen bei der *in vivo* Regulation des humanen Reningens geben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	KSG 112 SYSTEC DX 23
Computer	Dell, Presision 690 Computer System
Eismaschine	Ziegra, Eismaschinen
Elektrophoreseapparatur	Life Technologies Inc., Mod S2 Pharmacia, LKB 2050 MIDGET
Filtersets	
TRITC-Filter:	Zeiss, filter set 43 Anregung 533-558 nm Emission 570-640 nm
Cy2-Filter:	Zeiss, filter set 38 HE Anregung 450-490 nm Emission 500-550 nm
Fluoreszenzlampe	EXFO, X-Cite 120
Grafikkarte	nVidia Quattro FX 4500
Heißluftschüttler	New Brunswick Scientific, Innova 4000
Homogenisator	Janke & Kunkel, Ultra-Turrax T25
Inkubationsschrank	Heraeus, Modell B6200 Forma Scientific, Water Jacked Incubator
Kamera	Zeiss, AxioCam MRm
Kryotom	Leica, CM 3050S

Kühl- und Gefrierschränke	AEG, Santo Kühlschrank Liebherr, Comfort plus Gefrierschrank Privileg, Öko Super Energiesparer Privileg, de luxe Siemens, Comfort plus Gefrierschrank Thermo Electron Corporation, Hera freeze
Luminometer	Berthold Technologies, Centro XS ³ LB960
Magnetrührer	Heidolph, MR 80 Heidolph, MR 3001 K
Mikroskope	Zeiss, Invertoskop ID03 Zeiss, AxioStar 1122-100 Zeiss, Axioskop2 plus 1051-078 mit Axio Cam 412 314 Zeiss, Axiovert 200M
Mikrotom	Leica, Rotationsmikrotom RM2165
Mikrowelle	Sharp, Mikrowelle
Ölpumpe	Edwards, High Vacuum Pump Type B5/2208
PCR-Geräte	MWG, Mod. Omnigene Thermocycler Perkin Elmer Cetus, DNA Thermo Cycler PqLab, Primus 96 PqLab, Primus 96 Gradient Roche, Lightcycler Roche, Lightcycler 480 Sensoquest labcycler
pH-Meter	Knick, Digital pH-Meter
Pipetten	Gilson, Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000
Schüttler	GFL, 3017 Edmund Bühler, SM25
Spannungsquellen	Pharmacia, LKB ECPS 3000/150 Pharmacia, LKB GPS 200/400 Pharmacia, Multidrive XL

Sterilbank	Gelaire Flow Laboratories, HF 72 Jouan LC2.12
UV-Leuchttisch	Renner, Fluorescent Tables
UV-Spektrometer / Photometer	Pharmacia Biotech, Gene Quant II
Vakuumzentrifuge	Fröbl, Univapo 150 H
Vortexgeräte	Scientific Industries, Vortex Genie Scientific Industries, Vortex Genie 2 Heidolph, REAX 1
Waagen	Mettler, Analysewaage H-20T Mettler, Analysewaage AB 54 Mettler, Feinwaage P-1210 Mettler, Feinwaage W13
Wärmeblöcke	Eppendorf, Thermostat 5320 Eppendorf, Thermomixer 5436
Wärmeplatte	Leica, HI 1220
Wärmeschränk	Memmert, Modell 300
Wasserbäder	Haake, Modell W13 Haake, Modell W19 GFL, 083
Zentrifugen	Hereaus, Megafuge 1.0 Heraeus, Labofuge 400 Hermle, Z300 Eppendorf, Centrifuge 5414 Eppendorf, Centrifuge 5417C Eppendorf, Centrifuge 5417R Sorvall, RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge Sorvall, RC 5C Plus Sigma, 2 k 15 Kühlzentrifuge

2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial

Chemikalien/Enzyme/ Verbrauchsmaterial	Hersteller
5xFS-Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, Promega
6x Loading Dye	MBI-Fermentas, St. Leon
100 bp und 1 kb DNA Ladder	MBI-Fermentas, St. Leon
Agarose	Sigma, Deisenhofen, Biozym
Agarose peqGOLD Universal	Peqlab
alle nicht anderweitig aufgeführten Chemikalien	Merck
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Auslaufpipetten (5 ml, 10 ml und 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Greiner Bio One
β-Mercaptoethanol	Roth
Bacto™ Agar	DIFCO, Detroit (USA)
Bacto™ Pepton,	DIFCO, Detroit (USA)
Bacto™ Yeast Extract	DIFCO, Detroit (USA)
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
complete Mini Protease Inhibitor	Roche, Mannheim
Cocktail Tablets	
Deckgläschen	Labonord
Diethypyrocarbonat DEPC	Fluka, Buchs
DMSO	Sigma, Deisenhofen
DpnI-Restriktionsenzym	Stratagene
DTT 100mM	Promega, Madison (USA)
Dual Luciferase Kit	Promega
Endothelin1	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Expand Long Template PCR System	Roche, Mannheim
Falcon Tubes 15 ml, und 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Greiner Bio One
Filter	Schleicher & Schuell
Formaldehyd	Sigma, Deisenhofen

Forskolin	Sigma, Deisenhofen
Fugene-6	Roche, Mannheim
Gene Ruler	MBI-Fermentas, St. Leon
Gewebe-Einbettkassetten	Labonord
Gießformen	Roth
Glaswaren	Schott, Wertheim/Main, Roth
Glitazone	Cayman
Glycergel Mounting Medium	Dako Cytomation
Glycerine	Sigma, Deisenhofen, Roth
Glycin	Sigma, Deisenhofen
GoTaq DNA Polymerase 5U/ μ l	Promega, Madison (USA)
GoTaq Reaction Buffer Green	Promega, Madison (USA)
5x bzw. Colorless 5x	
Handschuhe	Romed, Hartmann, Roth
Isotone NaCl ₂ -Lösung 0,9%	Braun
Ketamin	CP-Pharma
Kompetente <i>E.coli</i> JM109	Promega, Madison (USA)
λ HindIII DNA Ladder	MBI-Fermentas, St. Leon
LightCycler ^{®480} -96well-Reagierplatten	Roche, Mannheim
LightCycler ^{®480} SYBRGreenI Master	Roche, Mannheim
Lightcycler Kapillaren	Roche, Mannheim
Liquid Blocker	Labonord
Medien	Pan Biotech
M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/ μ l)	Invitrogen, Karlsruhe, Promega
Nagerfutter (0,4% \leq 0,04% NaCl)	Ssniff Spezialdiäten
NEA (nicht essentielle Aminosäuren)	Pan Biotech
Objektträger, Superfrost Plus	Menzel-Gläser
oligo(dT) ₁₅ Primer 0,5 μ g/ μ l	Promega, Madison (USA)
PACAP	TOCRIS bioscience
Parafilm	American National Can
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Paraplast-Plus Paraffin	Sherwood
PBS	Calbiochem

PCR Nucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 2,5mM)	Promega, Madison (USA)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pferdeserum (Horse Serum)	Sigma, Deisenhofen
Pfu-Polymerase	Stratagene
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	Biozym, Greiner Bio One, Sarstedt
Plasmid Maxi (25) Kit	Qiagen, Hilden
Präparatekästen	Roth
PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega, Madison (USA)
QuantiTect™SYBR®Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
QUICKChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Reagiergefäße(0,2 ml 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Greiner Bio One
Restriktionsenzyme und Puffer	Amersham Biosciences; Freiburg MBI-Fermentas, St. Leon
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
RNase-free DNase I	Amersham Biosciences; Freiburg
RNase-Zap	Ambion
RNasin Ribonuclease Inhibitor 40 U/μl	Promega, Madison (USA)
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Sevofluran SEVOrane®	Abbot
Skalpellklingen	Feather
Silikonkautschuk	Roth
Sterilfilter	Renner, Millipore Molsheim (Frankreich)
SuperRNasein	Ambion
Synthese von Oligonukleotiden	MWG-Biotech, Ebersberg
Taq DNA-Polymerase und Puffer	Roche, Mannheim
Tissue-Tek®	Sakura, NL
Trypsin/EDTA 0,05 % / 0,02%	Sigma, Biochrom AG, Pan Biotech
X-Gal	Promega, Madison (USA)
Xylazin	Ratiopharm
Xylencyanol	Sigma, Deisenhofen
Zellkulturfl. (25cm ² , 75cm ² und 125 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht, Greiner Bio One

2.1.3 Antikörper

Antikörper	Art	Hersteller
Chicken Anti-Renin IgG	Primärantikörper	Davids Biotechnologie
Mouse Anti-SMA IgG	Primärantikörper	Beckman Coulter, Immunotech
Donkey Anti-Chicken IgG	Sekundärantikörper	Dianova
Donkey Anti-Mouse IgG	Sekundärantikörper	Dianova

2.1.4 Primer

Name	Sequenz	Verwendung
hRen_Mut3_1	5'-ctg caa cct cct gac cgt atc acc aac cac gc-3'	Mutation der EnhancerCRE-Sequenz in hRenLacZ
hRen_Mut3_2	5'-gcg tgg ttg gtg ata cgg tca gga ggg tgc ag-3'	Mutation der EnhancerCRE-Sequenz in hRenLacZ
hRen_Mut4_1	5'-ctt cac cca cct agc tct gat gtg cag tga gat tta ttg c-3'	Mutation der CNRE- Sequenz proximal in hRenLacZ
hRen_Mut4_2	5'-gca ata aat ctc act gca cat cag agc tag gtg ggt gaa g-3'	Mutation der CNRE- Sequenz proximal in hRenLacZ
hRenLC_fo	5'-atg aag ggg gtg tct gtg ggg tc-3'	Amplifikation einer Sequenz der humanen Renin-cDNA
hRenLC_rev	5'-gga tat cca tgg cgt gga tgg cc - 3'	Amplifikation einer Sequenz der humanen Renin-cDNA
hActinLC_fo	5'-ctt cta caa tga gct gcg tgt gg-3'	Amplifikation einer Sequenz der humanen Aktin-cDNA
hActinLC_rev	5'-gag gat ctt cat gag gta gtc ag-3'	Amplifikation einer Sequenz der humanen Aktin-cDNA
mActin_LC_1	5'- ccg ccc tag gca cca ggg tg -3'	Amplifikation einer Sequenz der murinen Aktin-cDNA
mActinLC_2	5'-ggc tgg ggt gtt gaa ggt ctc aaa- 3'	Amplifikation einer Sequenz der murinen Aktin-cDNA

mRenLC_1	5'-atg aag ggg gtg tct gtg ggg tc-3'	Amplifikation einer Sequenz der murinen Renin-cDNA
mRenLC_2	5'-atg tcg ggg agg gtg ggc acc tg-3'	Amplifikation einer Sequenz der murinen Renin-cDNA
hGAPDH_fo	5'-cca cat cgc tca gac acc at-3'	Amplifikation einer Sequenz der humanen GAPDH-cDNA
hGAPDH_rev	5'-ggc aac aat atc cac ttt acc aga gt-3'	Amplifikation einer Sequenz der humanen GAPDH-cDNA
minRAR1mut_se	5'-cca tcc gga aac ctt tgt acc ctt ctt cca cct agc tct gtc c-3'	Mutation der pal3-Sequenz im minimalen humanen Renin-Promotor
minRAR1mut_rev	5'-gga cag agc tag gtg gaa gaa ggg tac aaa ggt ttc cgg atg g-3'	Mutation der pal3-Sequenz im minimalen humanen Renin-Promotor
minCNREmut_1	5'-ccc acc tag ctc tca tgc gtc gtg aga ttt att gc -3'	Mutation der CNRE-Sequenz im minimalen humanen Renin-Promotor
minCNREmut_2	5'-gca ata aat ctc acg acg cat gag agc tag gtg gg-3'	Mutation der CNRE-Sequenz im minimalen humanen Renin-Promotor
hproxRAR1mut2_1	5'-cca tcc gga aac ctg ttt acc ctt cat tca cct agc tct gtc c-3'	zweite Mutation der pal3-Sequenz im minimalen humanen Renin-Promotor
hproxRAR1mut2_2	5'-gga cag agc tag gtg aat gaa ggg taa aca ggt ttc cgg atg g-3'	zweite Mutation der pal3-Sequenz im minimalen humanen Renin-Promotor
proxCREfirst_1	5'-cgc gat cgc agc gac aca aga ttg ctt tcc cac agc tgt cct tcc-3'	Anfügen der proximalen CRE-Sequenz an das Plasmid hRenMin 1. Teil
proxCREfirst_2	5'-gga agg aca gct gtg gga aag caa tct tgt gtc gct gcg atc gcg-3'	Anfügen der proximalen CRE-Sequenz an das Plasmid hRenMin 1. Teil
proxCREsecond_1	5'-ggg cgc gcc aaa gct ttg ttt aac tag cgt cac tgg aca caa gat tgc ttt ccc-3'	Anfügen der proximalen CRE-Sequenz an das Plasmid hRenMin 2. Teil
proxCREsecond_2	5'-ggg aaa gca atc ttg tgt cca gtg acg cta gtt aaa caa agc ttt ggc gcg ccc-3'	Anfügen der proximalen CRE-Sequenz an das Plasmid hRenMin 2. Teil

proxRAR1mut3fo	5'-cca tcc gga aac ctt tga tcc ctt tct tea cct agc tct gtc c -3'	dritte Mutation der pal3-Sequenz im minimalen humanen Renin-Promotor
proxRAR1mut3rev	5'-gga cag agc tag gtg aag aaa ggg atc aaa ggt ttc cgg atg g-3'	dritte Mutation der pal3-Sequenz im minimalen humanen Renin-Promotor
CREconsens1	5'-ggg cgc gcc aaa gct ttg ttt aac tga cgt cac tgg aca caa gat tgc ttt ccc-3'	Anfügen der consensus CRE-Sequenz an das Plasmid hRenMin
CREconsens2	5'-ggg aaa gca atc ttg tgt cca gtg acg tca gtt aaa caa agc ttt ggc gcg ccc-3'	Anfügen der consensus CRE-Sequenz an das Plasmid hRenMin
CREenhancer1	5'-ggg cgc gcc aaa gct ttg ttt aac tga cat cac tgg aca caa gat tgc ttt ccc-3'	Anfügen eines Enhancer-Fragments, welches die CRE- Sequenz beinhaltet, an das Plasmid hRenMin (1.Schritt)
CREenhancer2	5'-ggg aaa gca atc ttg tgt cca gtg atg tca gtt aaa caa agc ttt ggc gcg ccc-3'	Anfügen eines Enhancer-Fragments, welches die CRE- Sequenz beinhaltet, an das Plasmid hRenMin (1.Schritt)
enhCREtoRARrev_1fo	5'-gcg cca aag ctt tgt cca cgc aga tgg tga cct ggc cat act gg-3'	Anfügen eines Enhancer-Fragments, welches die CRE- Sequenz beinhaltet, an das Plasmid hRenMin (2.Schritt)
enhCREtoRARrev_1rev	5'-cca gta tgg cca ggt cac cat ctg cgt gga caa agc ttt ggc gc-3'	Anfügen eines Enhancer-Fragments, welches die CRE- Sequenz beinhaltet, an das Plasmid hRenMin (2.Schritt)
enhCREtoRARrev_2fo	5'-gtc ccc gcg ggg cgc gcc tga cat cac caa cca cgc aga tgg tga cc-3'	Anfügen eines Enhancer-Fragments, welches die CRE- Sequenz beinhaltet, an das Plasmid hRenMin (3.Schritt)
enhCREtoRARrev_2rev	5'-ggt cac cat ctg cgt ggt tgg tga tgt cag gcg cgc ccc gcg ggg ac-3'	Anfügen eines Enhancer-Fragments, welches die CRE- Sequenz beinhaltet, an das Plasmid hRenMin (3.Schritt)
LZ3	5'-atc gta atc acc cga gtg tg-3'	Amplifikation einer Sequenz der transgenen LacZ-cDNA

LZ4	5'-taa tca gcg act gat cca cc-3'	Amplifikation einer Sequenz der transgenen LacZ-cDNA
L32forward	5'-tta agc gaa act ggc gga aac-3'	Amplifikation einer Sequenz der murinen L32-cDNA
L32antisense	5'-ttg ttg ctc cca taa ccg atg -3'	Amplifikation einer Sequenz der murinen L32-cDNA

2.1.5 Medien, Puffer und Lösungen

2.1.5.1 Immunhistochemie

Fixierlösung für Perfusion:	1xPBS 4 % Paraformaldehyd
Equilibrierlösung:	5 mM K ₃ [Fe(CN) ₆] 5 mM K ₄ [Fe(CN) ₆] 10 mM EDTA, pH 8,0 10 mM NaPhosphat-Puffer, pH 8,0 5 mM MgCL ₂ 20 mM NaCl
Färbelösung:	Equilibrierlösung mit 1 mg/ml X-Gal
X-Gal-Stammlösung:	20 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid
Waschpuffer:	PBS Puffer 1 % BSA
Blockierlösung:	PBS Puffer 1 % BSA 10 % Horse Serum

2.1.5.2 Molekularbiologie

Agarose-Gel (1%):	100 µl DEPC-H ₂ O 1 g Agarose
Agarose-Gel (2%):	100 µl DEPC-H ₂ O 2 g Agarose
DEPC-H ₂ O:	1 ml DEPC zu 1 l H ₂ O zugeben, kräftig schütteln und über Nacht unterm Abzug stehen lassen; am nächsten Tag autoklavieren
dNTP-Lösung (2,5mM):	je 25 µl von dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 100 mM) 900 µl DEPC-H ₂ O
LB-/LB _{Amp} -Medium:	1 % NaCl 1 % Bacto-Trypton 0,5 % Bacto-Yeastextract für LB _{Amp} -Medium zusätzlich 100 µg/ml Ampicillin
LB-/LB _{Amp} -Agarplatten:	1 % NaCl 1 % Bacto-Trypton 0,5 % Bacto-Yeastextract 2 % Bacto-Agar für LB _{Amp} -Agarplatten zusätzlich 100 µg/ml Ampicillin
MEM:	Minimum Essential Medium von Harry Eagle EBBS 1,5 g/l NaHCO ₃ L-Glutamine

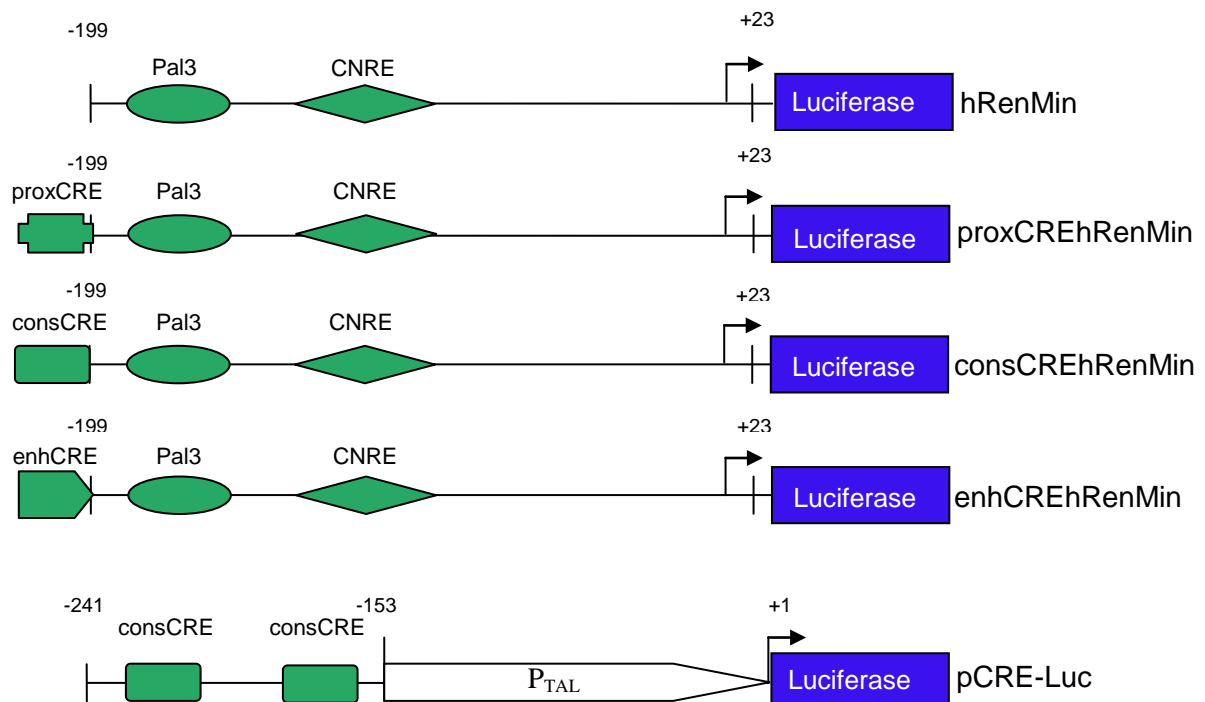
SOC-Medium:	20 g Bacto-Trypton
	5 g Yeastextract
	0,5 g NaCl
	2,5 ml 1M KCl
	10 ml 1M MgCl
	20 ml 1M Glucose
	ad 1 l H ₂ O
Zellkulturmedium:	500 ml MEM
	1 % Pen/Strep Lösung (1000 U Penicillin, 10mg/ml Streptomycin)
	10 % fetales Kälberserum
	1 % 100 mM Na-Pyruvat
	1 % nicht essentielle Aminosäuren
6x Loading Dye:	0,09 % Bromphenolblau
	0,09 % Xylencyanol
	60 % Glycerol
	60 mM EDTA
10xTBE:	108 g Tris
	55 g Borsäure
	40 ml 0,5 M Na ₂ EDTA (pH 8,0)
	ad 1 l H ₂ O
10xPBS:	80 g NaCl
	2 g KCl
	26,8 g Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O
	2,4 g KH ₂ PO ₄
	gelöst in 1 l H ₂ O, pH 7,4

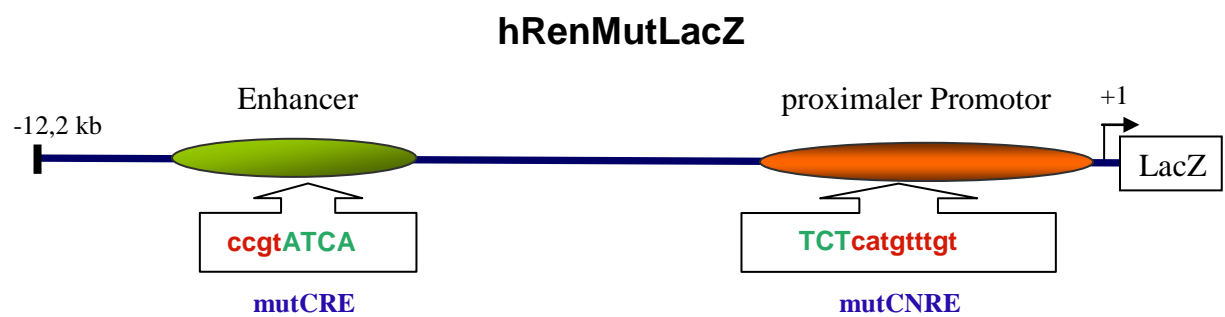
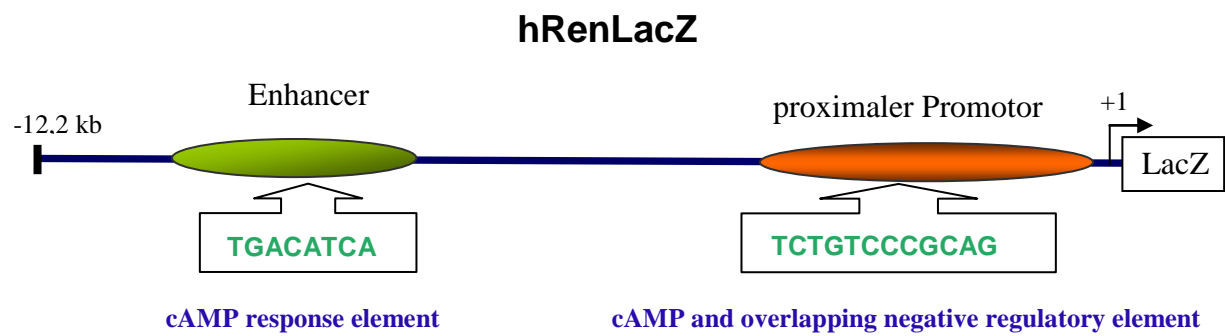
2.1.6. Luziferase- und LacZ-Reporter-Konstrukte

Der modifizierte pGL3 Vektor von Promega kodiert für ein Firefly-Luziferase-Reportergen unter Kontrolle des minimalen humanen Reninpromotors hRenMin (-199bp bis +23bp vom Transkriptionsstart) (Mrowka, Steege et al. 2007).

Für die *in vitro* Versuche in dieser Arbeit wurde an hRenMin das proximale Promotor CRE-Element, das consensus CRE-Element oder das Enhancer CRE-Element durch gerichteten Basenaustausch angefügt. Ausserdem wurde das Plamid pCre-Luc von Clontech verwendet. Dieses Plamid trägt vor der Luziferase zwei CRE-Elemente in Reihe.

Für die Generierung der transgenen Maus wurde das 12,2 kb große humane Reninpromotor Fragment hRen mutiert und daran das Reportergen LacZ kloniert. Es ist bekannt, dass dieses Fragment ausreicht, um das Reportergen zu exprimieren (Castrop et al., 2006). Sowohl die proximale Promotor CNRE-Sequenz als auch die distale Enhancer CRE-Sequenz wurden durch gerichteten Basenaustausch funktionslos mutiert. Hierbei entstand das Plamid hRenMutLacZ.





2.1.7 Mikroorganismen und eukaryotische Zelllinien

2.1.7.1 Prokaryoten

Chemisch kompetente *E.coli* JM 109 (Promega)

Chemisch kompetente *E.coli* One Shot[®] TOP10-Zellen (*Invitrogen*)

2.1.7.2 Eukaryoten

Human pulmonary carcinoma cell line Calu-6 (ATCC HTB-56)

2.1.8 Internetdienste und Software

Diese Arbeit wurde mit Hilfe von *Microsoft Office XP* geschrieben. Die Bildbearbeitung erfolgte mit *Adobe Photoshop 9.0* und *ImageJ* (Wayne Rasband. NIH. USA). Die gezeigten Graphen wurden mit *GraphPad Prism 3* und *Microsoft Office XP* erstellt. Bei der Literaturrecherche half PubMed von NCBI (The National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Für die Mikroskopie wurde *AxioVision Rel.4.5* von Zeiss und für die 3D-Rekonstruktion *Amira 4.1 visualization software* (Mercury Computer Systems, Inc., USA) verwendet.

Nebcutter: <http://www.tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden mit hRenMutLacZ Mäusen, hRenMutLacZ-AT_{1a}^{-/-} Mäusen und Kontroll-FVN-Mäusen (*Charles River*, Sulzfeld, Deutschland) beider Geschlechter durchgeführt. Die Versuchstiere wurden im 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

2.2.1.1 Generierung der hRenMutLacZ und hRenMutLacZ AT_{1a}^{-/-} Mäuse

Hierzu wurde als erstes das Plasmid, welches das Fragment hRenMutLacZ trägt, linearisiert und mit Hilfe eines Restriktionsverdaus das Fragment hRenMutLacZ herausgeschnitten, auf ein 0,5 % Agarosegel aufgetragen und anschließend aus dem Gel aufgereinigt. Die weiteren Schritte für die Generierung der transgenen Maus wurden von der Firma *PolyGene AG*, Rümlang, Schweiz durchgeführt.

Die hRenMutLacZ AT_{1a}^{-/-} Maus wurde durch Verpaarung der Mäuse hRenMutLacZ mit der AT_{1a}^{-/-} Maus generiert.

2.2.1.2 Genotypisierung

Um den Genotyp der Versuchstiere im Allgemeinen bzw. das Transgen LacZ im Speziellen zu bestimmen, wurde eine Genotypisierung durchgeführt.

Die Schwänze der zu untersuchenden Mäuse wurden mit einem Skalpell gekappt, in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt und mit 150 µl Viagen DirectPCR-Tail-Lösung und 3 µl Proteinase K von der Firma Peqlab vermengt. Der Lyseansatz wurde für mindestens 3 h bei 56°C unter Schütteln gehalten und anschließend für 45 min bei 85°C inkubiert. Nach der Lyse wurde eine Genotypisierungs-PCR durchgeführt.

Ansatz:

Template DNA	2 µl
4x Puffer-Mix	6 µl
Primer sense	1 µl
Primer antisense	1 µl
dNTPs	2 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
Wasser	auf 30 µl auffüllen

PCR-Programm (35 Zyklen):

Aktivation	Denaturation	Annealing	Elongation	Proof Reading	Store
94°C	94°C	58°C	72°C	72°C	8°C
3 min	1 min	1 min	1 min	5 min	

Nach der Genotypisierungs-PCR wurden die Ansätze auf ein Agarosegel (2%) aufgetragen.

2.2.1.3 Gelelektrophorese

Durch horizontale Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente nach aufgetrennt. Für Fragmente bis zu 300 bp wurden TBE Agarosegele mit 2 % Agarosegehalt, für Fragmente >300 bp TBE Gele mit 1 % Agarosegehalt verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V. Die Bande für den Nachweis des humanen Reninpromotors liegt bei 200 bp, die des endogenen murinen Reningens bei 600 bp.

2.2.1.4 Tierversuche

Für die molekularbiologischen und histologischen Versuche wurden Tiere im Alter von 60-80 Tagen verwendet. Die Versuche wurden wie folgt mit dem Mausstamm hRenMutLacZ durchgeführt:

Versuchsteil 1:

Kontrollgruppe (n=6): hRenMutLacZ Mäusen wurde im Nackenbereich subkutan ein Placebo-Pellet für 2 Tage injiziert.

Isoproterenol (n=6): hRenMutLacZ Mäusen wurde im Nackenbereich subkutan ein Isoproterenol Pellet (10 mg Isoproterenol/kg/Tag) für 2 Tage injiziert, um das Reninsystem zu aktivieren.

Versuchsteil 2:

Kontrollgruppe (n=6): Die hRenMutLacZ Tiere erhielten normales Futter (0,6 % NaCl) und normales Trinkwasser.

Enalapril (n=6): Um das Reninsystem der hRenMutLacZ Mäuse zu stimulieren, wurden die Tiere für 7 Tage mit dem angiotensin-converting-enzym (ACE)-Inhibitor Enalapril (10 mg/kg/Tag), gelöst in Trinkwasser behandelt.

Niedrigsalz (n=6): Um das Reninsystem der hRenMutLacZ Mäuse zu stimulieren, wurden die Tiere für 10 Tage mit Niedrigsalz-Futter (0,024 % NaCl) behandelt.

Hochsalz (n=6): Um das Reninsystem der hRenMutLacZ Mäuse zu hemmen, wurden die Tiere für 10 Tage mit Hochsalz-Futter (4 % NaCl) behandelt.

Wasserdeprivation (n=6): Um das Reninsystem der hRenMutLacZ Mäuse zu stimulieren, wurde den Mäusen für 24 Stunden das Trinkwasser entzogen.

Am Ende der Behandlungszeit wurde aus jeder Gruppe ein Tier mit Sevofluran anästhesiert und anschließend ein Genickbruch durchgeführt. Der Thorax der Tiere wurde geöffnet, die Nieren heraus präpariert, halbiert und je eine halbe Niere in Kortex und Medulla zonierte. Bis zur RNA-Isolation wurden die Organe bei -80°C gelagert.

2.2.3 Histologische Methoden

2.2.3.1 PFA-Fixierung und Präparation der Organe

Das Fixieren führt zum Erhalt von Organ- bzw. Zellstruktur durch Härtung des Materials, indem es zur Ausbildung von Querverbindungen zwischen den Proteinen führt. Ausserdem soll es sowohl die Autolyse durch freiwerdende Enzyme als auch die mikrobielle Zersetzung des Gewebes von außen verhindern (Hess und Sinowatz, 2000). Durch die Fixierung wird ebenso eine bessere Schneidbarkeit des Gewebes erwirkt. Verschiedene Organ-Fixierungen müssen immer ausgetestet und miteinander verglichen werden, um die optimalen Bedingungen für einen Enzymnachweis zu finden. Hier führte eine 3 %ige PFA-Perfusionsfixierung zum besten Resultat.

2.2.3.1.1 PFA-Perfusionsfixierung der Organe adulter Mäuse

Adulte hRenMutLacZ Mäuse nach Ablauf der Behandlungszeit und hRenMutLacZ AT₁^{-/-}-Mäuse wurden mit einer Kombination aus Ketamin und Xylazin (80 mg/kg i. p.) anästhesiert. Der Thorax wurde mit einer Schere geöffnet und die zu perfundierende Aorta freigelegt. Die Kanüle wurde in die Aorta eingeführt und die Vorperfusion mit PBS begonnen, um das Blut komplett herauszuspülen. Danach folgte die Fixierung der Organe mit 3% Paraformaldehyd in PBS und Präparation der Organe. Die Organe wurden in 18 % Saccharose in PBS üN bei 4°C inkubiert, um eine eventuelle Kristallbildung und damit eine Zerstörung der Organstruktur beim späteren Einfrieren zu verhindern. Am nächsten Tag wurden die fixierten Organe in Tissue Tec (Sakura) gelegt und langsam über flüssigem Stickstoff eingebettet. Die Lagerung der Tissue Tec-Organ-Würfel erfolgt bei -80°C.

2.2.3.2 Herstellung von Gefrierschnitten für Immunhistochemische und X-Gal-Färbung

Für Übersichtsfärbungen der einzelnen Organe wurden Einzelschnitte mit 5 μ M Schnittdicke im Kryostat bei einer Blocktemperatur zwischen -15 und -29 °C angefertigt. Für 3D-Glomeruli-Rekonstruktionen wurden 3 μ M Serienschnitte von Nieren bei einer Blocktemperatur zwischen -15 und -29°C angefertigt. Die Schnitte wurden auf Superfrost Plus Objektträger (Menzel-Glaser) aufgetragen und bis zur weiteren Verarbeitung zwischen 30 min und 3 h luftgetrocknet.

2.2.3.3 Histologischer Nachweis der β -Galaktosidase-Expression durch X-Gal-Färbung

X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside) ist ein Substrat der β -Galaktosidase und wird dadurch hydrolytisch gespalten, wobei durch nachfolgende Oxidation eines der Edukte ein blauer Farbstoff entsteht (5,5'-Dibromo-4,4'-dichlorindigo). Als Nebenprodukt entsteht Galaktose.

Sowohl die 3 μ M als auch die 5 μ M Gefrierschnitte wurden mit einem Fettstift umrandet und für 10 min mit einer Equilibrierlösung bei RT inkubiert. Danach wurde die Lösung abgesaugt und die Schnitte mit einer Färbelösung (Equilibrierlösung mit 1 mg/ml X-Gal) überschichtet. Es folgte eine Inkubation der Färb-Ansätze für 10 min bzw. 24 h in einer Dunkelkammer bei RT. Zum Stoppen der Reaktion wird die Färbelösung abgesaugt, die Schnitte dreimal kurz in destilliertem Wasser gewaschen, trockengesaugt, falls notwendig für 1 min mit Kernechtrot gegengefärbt und mit 40 % Glycerol eingedeckelt. Um eine endogene β -Galaktosidase-Aktivität auszuschließen, wurden parallel zu oben genannten Färbungen X-Gal-Färbungen von Schnitten aus LacZ-negativen Mäusen (Wildtyp-Mäuse) durchgeführt.

2.2.3.4 Immunhistochemie

Unter Immunhistochemie versteht man den Nachweis und die Identifikation antigener Komponenten durch Antikörper. Dieser Nachweis beruht auf der Affinität eines Antikörpers zu einer bestimmten Gewebeeigenschaft (Epitop) als sogenannte Antigen-Antikörper-Reaktion. Im Idealfall kommt es zu einer spezifischen und starken Bindung zwischen Antikörper und Epitop. Der Antikörper ist mit einem Detektionssystem gekoppelt, das sein Vorhandensein im Präparat sichtbar macht. Mittels verschiedener Detektionssysteme, wie Fluoreszenzfarbstoffe, Enzyme, Goldpartikel können schon geringe Mengen an Epitop verstärkt dargestellt werden (Romeis, 1989).

2.2.3.4.1 Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung

Die vorher mit X-Gal gefärbten Schnitte wurden indirekt immunfluoreszent doppelgefärbt. Durch Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge wird die Fluoreszenz des Antikörperkomplexes, bestehend aus einem primären und sekundären Antikörper, detektiert. Der primäre Antikörper bindet an das Epitop des zu untersuchenden Antigens (Protein), der sekundäre Antikörper bindet an den speziesspezifischen primären Antikörper, welcher den signalemittierenden Fluorophor trägt.

Nachdem bei der X-Gal-Färbung die Schnitte dreimal gewaschen wurden, wurden diese nicht wie oben beschrieben in 40 % Glycerol eingedeckelt, sondern mit einem Fettstift einzeln umrandet. Zur Abschwächung unspezifischer Bindungen wurden die Schnitte mit Blockierlösung (10 % BSA, 1 % HS in PBS) überschichtet und für 20 min bei RT geschüttelt. Nach Absaugen der Blockierlösung folgte eine Inkubation aller Schnitte mit den in Blockierlösung vorverdünnten primären Antikörpern bei 4°C üN: mouse anti- α SM-Aktin (1:50) IgG und chicken anti-Renin (1:400) IgG. Am darauf folgenden Tag wurden die Schnitte dreimal mit einer Waschlösung (10 % BSA in PBS) gewaschen und mit den sekundären fluorophorkonjugierten Antikörpern inkubiert.

- Reninfärbung: Cy2-konjugierter donkey anti-chicken IgG (1:400)
- Aktinfärbung: TRITC-konjugierter donkey anti-mouse IgG (1:400)

Die Inkubation der Färbeansätze erfolgt für 2 h bei RT in einer Dunkelkammer, da die Antikörper extrem lichtempfindlich sind. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die

Schnitte dreimal mit Waschlösung (PBS-Puffer) im Dunkeln für fünf Minuten geschüttelt und mit Glycergel eingedeckelt.

2.2.3.5 Mikroskopie und Bilddigitalisierung

Die Digitalisierung der immunfluoreszent und X-Gal gefärbten adulten Einzel- und Serienschnitte erfolgte mit Hilfe eines *Axiovert200M*-Mikroskops mit motorisierter Objektauflage, *AxioCam plus* sowie der Software *AxioVision* von Zeiss.

Einzelschnitte von unterschiedlichen Organen, sowie Serienschnitte der Niere wurden in verschiedenen Vergrößerungen aufgenommen. Mit Hilfe des Fluoreszenzfilters für TRITC wurde die Fluoreszenz für Glattnuskelaktin mit einer Wellenlänge von 533-558 nm angeregt und damit die glatte Gefäßmuskulatur bei einer Emission von 570-640 nm in rot sichtbar. Bei einer Änderung des Fluoreszenzfilter von TRITC auf Cy2 wurde mit einer Wellenlänge von 450-490 nm angeregt und somit das Fluoreszenzsignal von Renin mit einer Emission von 500-550 nm sichtbar. Wichtige Parameter wie Belichtungszeit, Kontrast und Gammakorrektur wurde zunächst für beide Kanäle eingestellt, bevor die Serienschnitte abgelichtet wurden. Um die Blaufärbung der zusätzlich mit X-Gal gefärbten Schnitte zu digitalisieren, wurden die Einstellungen der immunfluoreszent aufgenommenen Bilder übernommen und mit der *AxioCam plus* Farbbilder der Schnitte aufgenommen. Die drei Bilder wurden dann nachträglich mit der Software *AxioVision* überlagert und im Rot-Grün-Blau (RGB)-Farbraum gespeichert. Bilder von nur mit X-Gal gefärbten Schnitten wurden als Einzelbilder mit der Farbkamera aufgenommen.

2.2.3.5.1 Quantifizierung der LacZ-positiven Glomeruli

Um einen histologischen Vergleich von X-Gal Färbungen am vaskulären Pol der Glomeruli zwischen den Kontroll-Mäusen und den mit Enalapril behandelten Mäusen durchführen zu können, wurden zunächst wie oben beschrieben Gesamtnierenschnitte gefärbt und davon Einzelbilder mit 200-facher Vergrößerung nachträglich mit dem Programm *Adobe Photoshop* zu Gesamtnierenbilder zusammengesetzt. Die Signalauswertung erfolgte nach Import der Bilder in das frei zugängliche *Image J* (Wayne

Rasband, NIH, USA). Positive Glomeruli wurden markiert und durch die Anzahl der Gesamtglomeruli geteilt.

2.2.3.5.2 Dreidimensionale Rekonstruktion

Für die 3D-Rekonstruktion der Glomeruli einer hRenMutLacZ Maus und einer hRenMutLacZ-AT_{1a}^{-/-} Maus wurden 40 Kryo-Serienschnitte von je 3 µM Schnittdicke angefertigt. Die Schnitte wurden wie oben beschrieben auf Renin, α-Glattmuskelaktin und LacZ immunfluoreszent bzw. X-Gal gefärbt und einerseits mit dem Fluoreszenzmikroskop eine Mehrkanalbildaufnahme, andererseits mit dem Lichtmikroskop/Farbkamera eine Farbaufnahme bei 400-facher Vergrößerung erstellt. Nach der Aufnahme der Bilder folgte die Farbkanaltrennung des RGB-Bildstapels mittels *Image J* (Wayne Rasband, NIH, USA), um es der Rekonstruktionssoftware zu ermöglichen, die Fluoreszenzmarkierungen anhand der Grauwerte der Pixel von jedem aufgenommenen Bild zu erkennen. Hierbei entstanden drei separate Stapel: α-Glattmuskelaktin, Renin und LacZ. Da die Kryo-Serienschnitte unterschiedlich auf den Objektträgern angeordnet waren, mussten die drei Stapel in die gleiche Orientierung gebracht d.h. aligniert werden. Dieser und der letzte Schritt, die Datensegmentierung wurden mit der Software „*Amira 4.1. Visualization Software*“ auf einem „*Dell Precision 690 Computer System*“ durchgeführt. Bei der Datensegmentierung wurden die Renin und α-SMA-Signale, orientiert an den unterschiedlichen Grauwerten des Bildes und die LacZ-Signale, orientiert an den unterschiedlichen Blaustufen des Farbbildes mit Hilfe einer Reihe von Segmentierungswerkzeugen des Programms markiert und in Labelsets zusammengefasst, welche als Grundlage für die Berechnung der 3D-Modelle dienten. Aus jedem Set wurde eine separate Oberfläche generiert, räumlich dargestellt und schlussendlich aus Aktin, Renin und LacZ-Färbung ein 3D-Glomerulum mit vaskulärem Pol zusammengestellt.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Kultivierung von Calu-6-Zellen

Die humane Renin-produzierende Lungenkarzinom-Zelllinie Calu-6 (ATCC HTB-56) wurde in full MEM-Medium unter folgenden Standardbedingungen kultiviert: 37°C und 5 % CO₂.

Die Zellen wurden in 75 cm²-Kulturflaschen gezogen. Bei einer Konfluenz der Zellen von 90% wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit sterilem PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurden die Zellen mit 3 ml einer 0,05 % Trypsin / 0,02 % EDTA-Lösung überschichtet. Die Protease Trypsin kapt die Lektine der extrazellulären Matrix der Zellen und löst somit die Anheftung dieser vom Flaschenboden. Weiterhin wurden 9 ml vorgewärmtes Kulturmedium hinzugefügt und die Zellsuspension in ein 50 ml Falcontube überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 2200 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml frischem full MEM-Medium resuspendiert.

Zum Weiterziehen der Zellen wurden aus dem 10 ml Ansatz 2 ml entnommen, in eine neue 75 cm²-Flasche gegeben und mit 10 ml full MEM-Medium aufgefüllt.

Zum Aussäen der Zellen in 24er Well-Platten wurden aus dem 10 ml Ansatz 30 µl entnommen und in einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden 100000 Zellen pro Well der 24er Well-Platte in einem Endvolumen von 500 µl ausgesät. Mit den ausgesäten Zellen wurden Transfektionen oder Stimulationen durchgeführt.

2.2.4.2 Lagerung der Zellen

Um Zellen wegzufrieren, wurde zunächst wie bei der Kultivierung vorgegangen. Nach dem Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 3 ml sterilem 8 % DMSO / full MEM-Medium resuspendiert und 1 ml davon in ein CryoTube überführt. Das Tube wurde in einen Cryo-Behälter, gefüllt mit 100 % Isopropanol, gestellt und langsam bei -80°C eingefroren. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

2.2.4.3 Kultivierung von prokaryotischen Organismen

2.2.4.3.1 Anzucht von *E.coli* Bakterien

E.coli Bakterien wurden über Nacht in LB-Medium unter Schütteln bei 220 rpm und 37°C oder auf LB-Agarplatten im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Zur Selektion von Ampicillin-resistenten, also Plasmid-tragenden Stämmen, wurde das Antibiotikum in der Konzentration von 100 µg/µl den Medien beigemischt.

2.2.4.3.2 Erstellen einer *E.coli* Dauerkultur

100 µl Glycerin (87 %) wurden mit 400 µl *E.coli* Suspension versetzt, kurz gevortext und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.4.4 Gerichteter Basenaustausch

Die Mutagenese-PCR dient dazu, Basensequenzen eines Plasmids nach Wunsch zu ändern. Durch Modifikation der Primer lassen sich die Mutationen während der Amplifikation gezielt und einfach platzieren. Hierzu wurde die QUICKChange™ Site-Directed Mutagenesis von Stratagene verwendet.

Ansatz:

Template DNA	50 ng
10x PFU Puffer	5 µl
Primer sense	1 µl
Primer antisense	1 µl
dNTPs	1 µl
PFU-Polymerase	1 µl
Wasser	auf 50 µl auffüllen

PCR-Programm (18 Zyklen):

Aktivation	Denaturation	Annealing	Elongation	Proof Reading	Store
94°C	94°C	58°C	72°C	72°C	8°C
4 min	45 sec	45 sec	1 kb/min	6 min	

Der PCR-Ansatz wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym DpnI für 1 h bei 37°C inkubiert. Dadurch wurde die mütterliche Plasmid-DNA zerschnitten, während die in der PCR neusynthetisierte mutagenierte DNA unberührt bleibt. DpnI schneidet nur methylierte DNA, neusynthetisierte DNA ist nicht methyliert. Der so behandelte PCR-Ansatz wurde direkt in *E.coli* transformiert und das Plasmid in einer Mini- oder Maxi-Präp reisoliert.

2.2.4.5 Transformation

Zur Transformation wurden chemisch kompetente *E.coli* JM109-Zellen (hergestellt nach Inoue) und One Shot® TOP10-Zellen (*Invitrogen*) verwendet. Nach Auftauen von 50 µl Zellsuspension auf Eis wurden 2 µl mutierte Plasmid-DNA hinzugefügt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert, anschließend für 1 min auf 42 °C erhitzt (Hitzeschock) und danach sofort für 2 min auf Eis gestellt. Nach den zwei Minuten wurden 250 µl SOC-Medium dazu pipettiert und der Ansatz 45 min im 37°C Heißluftschüttler bei 220 rpm geschüttelt. Nach Konzentrierung der Zellen wurden 50 µl Aliquots davon auf vorgewärmte LB-Ampicillin-Platten ausplattiert und üN im 37°C Brutschrank inkubiert.

2.2.4.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgt auf zwei Arten:

- 1. Mini-Präparation, um geringe Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten
- 2. Maxi-Präparation, um große Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten

Bei beiden Präparationsarten wurde der 25er Maxi-Präparations-Kit von *Qiagen* verwendet.

2.2.4.6.1 Mini-Präparation

Bei der Gewinnung von Plasmid-DNA im kleineren Maßstab (3 ml LB-Kultur) wurden zunächst *E.coli* Bakterien in 3 ml LB-Ampicillin-Medium im Heißluftschüttler bei 37°C über Nacht kultiviert. Am Tag 2 wurden 2 ml davon in ein 2 ml Eppendorf-Reagiergefäß überführt und 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 300 µl P1-Puffer (kalt) gelöst, kurz gevortext, 300 µl P2-Puffer dazugegeben und das Cup 5 min bei RT stehen gelassen. Es folgte die Zugabe von 300 µl P3-Puffer und Inkubation des Ansatzes für 20 min auf Eis. Anschließend wurde 15 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein frisches, mit 675 µl 100% Isopropanol versetztes 1,5 ml Cup überführt. Der Ansatz wurde bei 14000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen. Wiederum wurde für 15 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde 15 min im 37°C Trockenschrank getrocknet und anschließend in 50 µl DEPC-H₂O gelöst.

2.2.4.6.2 Maxi-Präparation

Bei der Gewinnung der Plasmid-DNA im großen Maßstab (100 ml LB-Kultur) wurden *E.coli* Bakterien in 100 ml LB-Ampicillin-Medium im Heißluftschüttler bei 37°C über Nacht kultiviert. Am Tag 2 wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 6000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Puffer P1 (kalt) resuspendiert und anschließend 10 ml Puffer P2 zugegeben. Nach einer Inkubation des Ansatzes für 5 min bei RT erfolgte die Zugabe von 10 ml Puffer P3 (kalt) gefolgt von einer Inkubation für 20 min auf Eis. Die lysierten Zellen wurden als nächstes für 30 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand auf ein Qiagen-tip 500 gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit Puffer QC wurde die Plasmid DNA in 10,5 ml Puffer QF eluiert und zum Eluat 15 ml 100 % Isopropanol zur Fällung der DNA zugegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 11000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Abschließend wurde für 10 min bei 11000 rpm

und 4°C zentrifugiert, das Pellet kurz luftgetrocknet und in 500 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

2.2.4.7 DNA-Sequenzanalyse

Alle Sequenzierungen von Plasmid-DNA wurden von der Firma *SequiServe* in Vaterstetten durchgeführt.

2.2.4.8 Transfektion

Bei der Transfektion wird dsDNA, in unserem Fall Reportergen-Konstrukte, in die eukaryotische Zelle eingeführt. Es gibt verschiedene Methoden, wie z.B.: Lipofektion, kationische Polymere, Mikroinjektion und Elektroporation. Für die Transfektion der Luziferase-Konstrukte und des 12,2 kb Humanreninpromotor-Konstruktes wurde die Lipofektion wie folgt beschrieben verwendet:

2.2.4.8.1 Lipofektion

Die zuvor in 24er Well-Platten ausgesäten Calu-6-Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenz Fugene-6 behandelt. Pro Well wurden in einem Reagiergefäß 98,8 µl Serumfreies Medium vorgelegt und mit 1,2 µl Transfektionsreagenz versetzt. Der Ansatz wurde für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde einerseits 0,1 µg RL 0 (Renilla-Luziferase, Kontrollvektor) und 0,5 µg des zu untersuchenden Plasmides (Firefly-Luziferase) und andererseits 1 µg des 12,2kb Humanrenin-Promotor-Konstruktes zugegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Nach dem Abnehmen des Kulturmediums aus dem Well wurden 400 µl Wachstumsmedium und 100 µl des Transfektionsansatzes auf die Zellen gegeben und für 24 h bei Standardbedingungen inkubiert.

2.2.4.9 Inkubation der Calu-6-Zellen mit Aktivsubstanzen

Die Zugabe von Aktivsubstanzen zu den Calu-6-Zellen erfolgte bei einer Konfluenz der Zellen von 90 %. Hierzu wurde das Medium der Wells abgenommen und durch 500 μ l frisches, mit folgenden Substanzen versetztes Medium ersetzt:

Aktivsubstanz	End-Konzentration	Inkubationszeit
Forskolin	5 μ M	4 h, 20 h
PACAP	300 nM	4 h, 20 h
Rosiglitazone	500 nM	20 h

2.2.4.10 Dual Luziferase Assay

Mittels dieser Methode kann der Einfluss regulatorischer Sequenzen auf die Transkription eines Gens untersucht werden. Hinter die zu untersuchende regulatorische Sequenz (Promoter/Enhancer) wird ein Reportergen geschaltet, welches mit speziellen biochemischen oder histologischen Methoden nachgewiesen werden kann. Wir verwendeten das Reportergen Luziferase. Wird das Luziferasegen transkribiert und translatiert, erzeugt das entstandene aktive Protein, nach Spaltung des entsprechenden Substrats einen Lichtblitz, welcher mit Hilfe eines sogenannten Luminometers detektiert wird. Die Intensität und Anzahl der Lichtblitze gibt somit rückwirkend Aufschluss über die Aktivität des Proteins und somit die Stärke der Transkription des Luziferasegens. Je mehr Lichtblitze umso mehr aktives Protein umso höher die Transkriptionsrate und umgekehrt. Somit kann mit verschiedenen Manövern die Regulation und die damit involvierten Sequenzen eines Gens untersucht werden. Ein zweites, nicht reguliertes Luziferase-Konstrukt (RL null) wird mit dem ersten ko-transfiziert und ebenso vermessen, um Transfektionsschwankungen auszugleichen (entsprechend dem Housekeeper bei der Real-Time-PCR).

Zur Isolation der zuvor transfizierten und mit Aktivsubstanzen behandelten Zellen wurde das Kulturmedium aus den Wells abgesaugt. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 100 μ l Passive Lysis Buffer mit anschließendem Schütteln bei 170 rpm für 15 min bei RT. Diese

Lysate wurden entweder bei -20°C weggefroren oder gleich weiter im Luminometer behandelt. Hierzu wurden pro Well 10 μl der lysierten Zellen auf eine speziell beschichtete 96er-Well Platte überführt und die Substrate für die Renilla- und Firefly-Luziferase automatisch hinzu pipettiert. Die Wellenlängen, die bei der Spaltung der Substrate der beiden Luziferasen auftreten, sind identisch. Deswegen fanden die Reaktionen der Luziferasen nacheinander statt, indem nach Aktion der Firefly-Luziferase dessen Substrat entfernt und gleichzeitig das Substrat der Renilla-Luciferase hinzu pipettiert wurde. Die relative Luziferase-Aktivität wurde als Verhältnis Firefly-Luziferase-Aktivität zu Renilla-Luziferase-Aktivität angegeben.

2.2.4.11 β -Gal Reporter Gene Assay

Mittels dieser Methode kann der Einfluss regulatorischer Sequenzen auf die Transkription eines Gens untersucht werden. Hinter die zu untersuchende regulatorische Sequenz (Promoter/Enhancer) wird ein Reporter-gen geschaltet, welches mit speziellen biochemischen oder histologischen Methoden nachgewiesen werden kann. Ich habe das Reporter-gen LacZ verwendet, welches das bakterielle Protein β -Galaktosidase kodiert.

Die erste Reaktion in diesem Assay ist eine enzymatische Reaktion. Nach der Lyse der Zellen folgt die Zugabe des Substrates der β -Galaktosidase, das Galakton plus. Dieses wird durch das bakterielle Enzym deglykosiliert. Da die Reaktion bei einem pH von 7,8 abläuft, ist einerseits nur die exogene β -Galaktosidase aktiv und andererseits bleibt das entstandene Produkt Dioxetan protoniert, wobei kein Lichtsignal entsteht. Das stabile Zwischenprodukt akkumuliert und solange der pH in diesem neutralen Bereich bleibt, bleibt das Produkt protoniert. Kommt es durch Zugabe der Initiations-Lösung zu einer Änderung des pH-Wertes auf pH 12, so wird das akkumulierte Zwischenprodukt deprotoniert und es zerfällt unter Emission von Licht einer Wellenlänge von 475 nm, welches im Luminometer gemessen werden kann (Lichtreaktion). Je mehr Lichtemission gemessen wird, umso mehr β -Galaktosidase war aktiv.

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90 % in 24er Well Platten geerntet. Nachdem die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen wurden, wurden 300 μl Lyse-reagenz pro Well auf die Zellen pipettiert und der Lyseansatz für 30 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation des Ansatzes für 2 min bei 12000 rpm und RT wird der Überstand in ein neues Cup überführt und die Proteinkonzentration davon bestimmt. Für die Enzymreaktion

wurden 50 µl einer Lyse-Lösung der Konzentration von 1,5 mg/ml Gesamtprotein eingesetzt. Nach Zugabe von 100 µl Substrat Reagenz wurde der Ansatz für 45 min bei leichtem Schütteln und RT inkubiert. Anschließend wurde 50 µl Initiations-Lösung im Luminometer automatisch hinzu pipettiert und die Lichtemission für 5 Sekunden gemessen.

2.2.4.12 RNA-Isolation

RNA wurde einerseits aus Calu-6-Zellen, andererseits aus Gewebe isoliert.

2.2.4.12.1 RNA-Isolation aus Calu-6-Zellen

Nachdem die Zellen für 8 h oder 20 h mit Aktivsubstanzen inkubiert wurden, wurde die gesamte RNA isoliert. Hierzu wurde der RNeasy-Kit von Qiagen verwendet. Alle Arbeiten wurden bei RT und mit RNase-freiem Material durchgeführt. Das Medium der Wells wurde abgesaugt und je 300 µl RLT-Puffer/ β -Mercaptoethanol (1 %) hinzu pipettiert. Nach der Zugabe von 300 µl EtOH 70 % pro Well wurde der gesamte Ansatz auf eine Säule des Kits aufgetragen. Nach einer Zentrifugation von 20 sec bei 12000 rpm wurde der Durchfluss verworfen. Als nächstes wurden auf die Säule 700 µl RW1-Puffer gegeben und wiederum für 20 sec bei 12000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Danach folgte ein zweimaliger Waschschrift mit je 500 µl RPE-Puffer, wobei einmal für 20 sec und einmal für 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert wurde. Abschließend wurde ohne Puffer trocken zentrifugiert und die RNA mit 18 µl RNase-freiem Wasser in ein frisches Cup durch eine Zentrifugation von einer Minute bei 12000 rpm eluiert.

2.2.4.12.2 RNA-Isolation aus Gewebe

Alle Arbeiten wurden bei RT und mit RNase-freiem Material durchgeführt. Es wurde der RNeasy-Kit von Qiagen verwendet. Zuvor präpariertes und bei -80°C gelagertes Nierengewebe wurde in flüssigen Stickstoff überführt und anschließend mit einem Mixer in 800 µl RLT-Puffer / β -Mercaptoethanol (1 %) homogenisiert und lysiert. Der komplette

Ansatz wurde auf eine RNeasy-Shredder-Säule gegeben und für 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert. 300 µl des Durchflusses wurden mit 300 µl 70 % EtOH vermischt und auf eine Säule des Kits aufgetragen. Der Rest des Durchflusses wurde bei -80°C gelagert. Es wurde wie bei der RNA-Isolation aus CaLu-6-Zellen fortgefahren, eluiert wurde mit 50 µl RNase-freiem Wasser.

2.2.4.13 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Plasmid-DNA- und die RNA-Proben wurden mit DEPC-H₂O 1:20 verdünnt und im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm vermessen. Der Quotient aus Protein- (280 nm) und Nukleinsäurekonzentration (260 nm) stellte ein Maß für die Reinheit der Proben dar.

2.2.4.14 Reverse Transkription

Die Synthese der copy DNA (cDNA) erfolgte durch die Reverse Transkriptase-Reaktion (RT). Hierzu wurden 1 µg RNA mit 10 µl RNase-freiem Wasser und 1 µl oligo d(T₁₅) (0,5 µg/µl) versetzt und für 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz kurz auf Eis gehalten und die kondensierte Flüssigkeit abzentrifugiert. Es folgte nun die Zugabe von:

- 4 µl first strand Puffer (FS Buffer)
- 4 µl dNTPs (je 2,5 mM)
- 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase

Der komplette 20 µl Ansatz wurde nun zur Synthese der cDNA 1 h bei 37°C im Thermocycler inkubiert, anschließend für 2 min auf 94°C erhitzt und nach Abkühlen auf Eis mit 30 µl DNase-freiem Wasser vermengt.

2.2.4.15 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Die quantitative Polymerasekettenreaktion wurde mit dem QuantiTectTM SYBR[®] Green PCR Kit von Qiagen oder mit dem Lightcycler 480[®] SYBR GreenI Master Kit von Roche in einem Roche LightCycler 480 durchgeführt. Der Reaktionsansatz von 20 µl besteht aus 10 µl QuantiTectTM SYBR[®] Green PCR Mastermix oder 10 µl Lightcycler 480[®] SYBR GreenI Master, je 1 µl des sense und antisense Primers (je 10 pmol), 6 µl zweifach destilliertem Wasser und 2 µl cDNA. Das Amplifikationsprotokoll besteht, nach einer Aktivierungsphase der HotStarTaqTM DNA-Polymerase von 15 min bei 95°C, aus 40 Zyklen mit 15 sec Denaturierungsphase bei 95°C, 20 sec Annealingphase bei 58°C und 20 sec Elongationsphase bei 72°C. Am Ende eines jeden Zyklus erfolgt die Fluoreszenzmessung. Um das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA zu analysieren, wurde nach Ablauf des Amplifikationsprogrammes die DNA langsam (0,1°C/sec) von 60°C auf 95°C erhitzt und dabei die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen.

2.2.4.16 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford-Test)

Um die Proteinkonzentration einer Lösung zu bestimmen, wird der Bradford-Test mit Hilfe von Bovine Serum Albumin (BSA) durchgeführt. Hierbei wird zuerst eine Standardkurve erstellt. Man stellt Lösungen von 1000 µg BSA/ml, 500 µg BSA/ml, 250 µg BSA/ml, 100 µg BSA/ml und 50 µg BSA/ml her. 20 µl jeder Konzentration werden mit 1 ml Dye reagent (vorherige 1:5 Verdünnung mit H₂O) versetzt, 15 min bei RT inkubiert und im Photometer vermessen. Die erhaltene OD wird gegen die Konzentration aufgetragen. Die zu untersuchenden Proben werden 1:10 und 1:100 mit H₂O verdünnt, 20 µl davon in 1 ml Dye reagent gegeben, 15 min bei RT inkubiert und ebenso im Photometer vermessen. Mit der erhaltenen OD kann man nun aus der Standardkurve, unter Berücksichtigung der Verdünnungen, die Proteinkonzentration bestimmen.

2.2.4.17 Statistik

Als statistische Größen wurden die arithmetischen Mittelwerte, deren Standardabweichung (STABWN) und die statistische Schwankung der Mittelwerte (SEM) verwendet. Um die Homogenität der Varianz zu untersuchen, wurden die Werte mit dem Levene's Test analysiert. Für mehrere Vergleiche verschiedener Gruppen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und eine anschließende Bonferroni Reduktion angewendet. Für Einzelvergleiche wurde der Student's *t*-Test durchgeführt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde bei $p < 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 *in vitro*

Der humane Reninpromotor enthält mindestens drei verschiedene cAMP-Zielsequenzen, welchen in der Literatur unterschiedliche funktionelle Bedeutungen zugeschrieben werden: Das Proximal Promotor cAMP response element (CRE, im weiteren CRE-Element oder CRE-Stelle bezeichnet), das Proximal Promotor cAMP and overlapping negative regulatory element (CNRE, im weiteren CNRE-Element oder CNRE-Stelle genannt) und das renale Enhancer CRE-Element. Aufgrund der teils widersprüchlichen und speziesspezifischen Ergebnisse früherer Studien über die Bedeutung dieser drei Elemente, wurden in der vorliegenden Arbeit Versuche durchgeführt, die von *in vitro*, zur Bestimmung der Relevanz der drei cAMP Zielsequenzen bei der cAMP-induzierten Regulation des Reningens bis *in vivo*, zur Aufklärung der Relevanz dieser Sequenzen in der physiologischen Regulation des Reningens reichen.

Hierzu wurden zu Beginn Transfektionen von verschiedenen Humanreninpromotor-Konstrukten in die humane Calu-6-Zelllinie durchgeführt. Diese immortalisierte Zelllinie weist eine endogene Reninexpression auf und hat mit den nativen Renin produzierenden JG-Zellen eine geringe basale Transkriptionsrate und die Induzierbarkeit durch cAMP gemein, was bedeutet, dass alle nötigen trans-Elemente des cAMP/PKA-Signalweges intrazellulär vorhanden sind.

3.1.1 Rolle des proximalen CNRE-Elements

Ein minimales humanes Reninpromotor-Konstrukt hRenMin (Abbildung 3.1), welches das Reporter-gen Luziferase steuert und die beiden cis-Elemente Pal3 und CNRE enthält, wurde als Grundgerüst verwendet und in den Calu-6-Zellen analysiert (Abbildung 3.2)

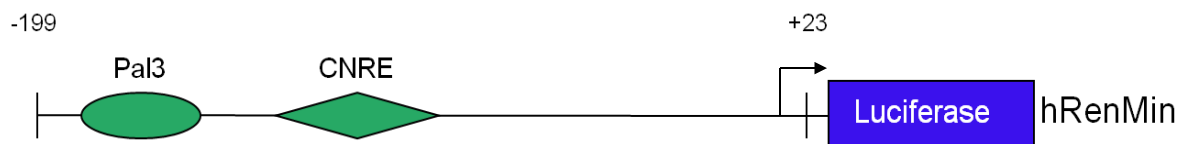


Abbildung 3.1: Konstrukt hRenMin mit den cis-Elementen Pal3 und CNRE

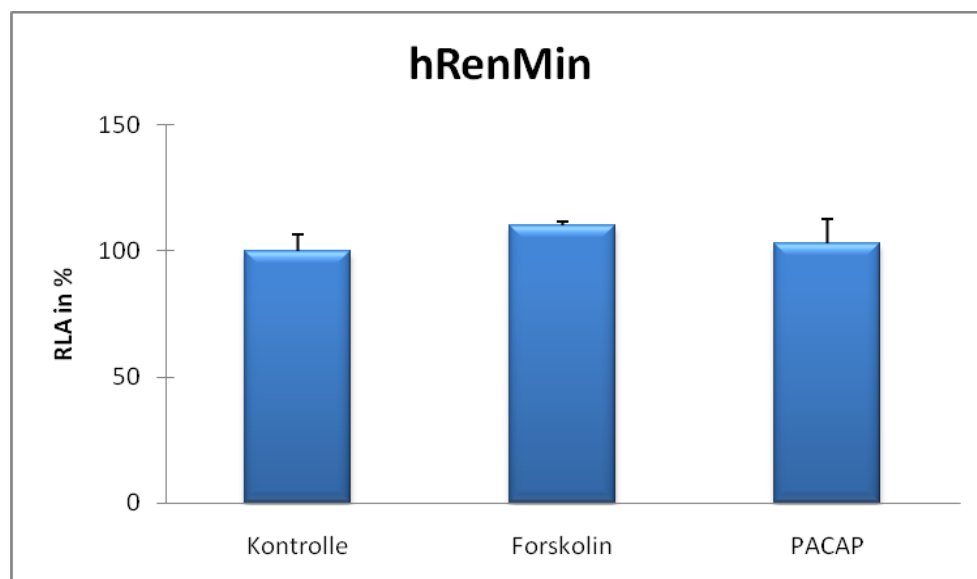


Abbildung 3.2: Renin Promotor-Aktivität in Calu-6-Zellen: Calu-6-Zellen wurden mit dem Konstrukt hRenMin für 24 h transfiziert und anschließend für 4 h mit Forskolin (5 μ M) und PACAP (300nM) inkubiert. Die Aktivität der Firefly-Luziferase wurde auf die der Renilla-Luziferase normalisiert (Relative Luziferase Aktivität, RLA). Die Werte wurden als prozentuale Abweichung zur Kontrolle (100 %) angegeben.

Um den zellulären cAMP-Spiegel zu erhöhen, wurde der direkte AC-Aktivator Forskolin oder das Neuropeptid PACAP, der über Gs-Protein gekoppelte Membran-Rezeptoren wirkt, verwendet.

Abbildung 3.2 zeigt, dass Forskolin bzw. PACAP zu keiner Änderung in der Aktivität des minimalen humanen Reninpromotors hRenMin führen.

Um die Tatsache auszuschließen, dass das Konstrukt in diesen Zellen prinzipiell unregulierbar ist, wurde ein Stimulationsmanöver der Zellen mit den PPARgamma Agonisten Rosiglitazone und Pioglitazone durchgeführt. Es ist bekannt, dass diese Substanzen ebenso wie freie Fettsäuren die Renin Gentranskription in Calu-6-Zellen stimulieren, indem sie intrazellulär an den Transkriptionsfaktor PPARgamma binden und über das Pal3-Element des humanen Reninpromotors die Renin Gentranskription aktivieren (Todorov et al., 2007, 2008). Da die Pal3-Stelle im humanen minimalen Promotor hRenMin vorhanden ist und die Calu-6-Zellen das Protein PPARgamma exprimieren, sollte eine Inkubation der transfizierten Zellen mit Glitazonen zu einer Aktivierung des Promotors führen.

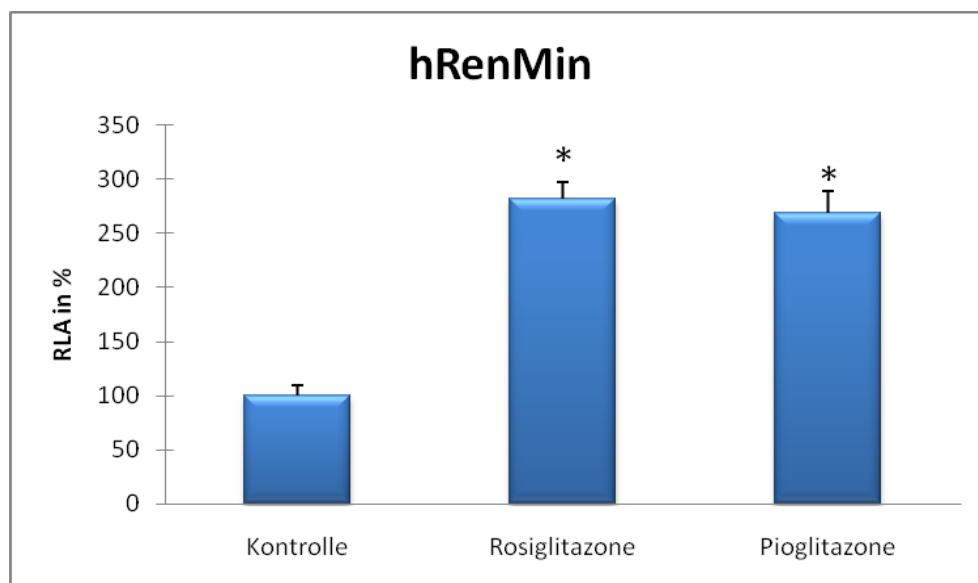


Abbildung 3.3: Renin Promotor-Aktivität in Calu-6-Zellen: Calu-6-Zellen wurden mit dem Konstrukt hRenMin für 24 h transfiziert und anschließend für 20 h mit Rosiglitazone (500 nM) bzw. Pioglitazone (500 nM) inkubiert. Die Aktivität der Firefly-Luziferase wurde auf die der Renilla-Luziferase normalisiert (RLA). Die Werte wurden als prozentuale Abweichung zur Kontrolle (100 %) angegeben. Als signifikant gekennzeichnet (*) wurden Werte mit $p < 0,05$.

In Abbildung 3.3 ist gezeigt, dass die beiden PPARgamma Agonisten Rosiglitazone oder Pioglitazone jeweils zu einer 2,8-fachen Aktivierung des minimalen humanen Reninpromotors führen. Daraus lässt sich eindeutig schließen, dass das Konstrukt in den Zellen im Prinzip regulierbar ist. Diese Befunde deuteten darauf hin, dass die CNRE-Stelle für die cAMP-induzierte Transaktivierung des Reningens nicht essentiell ist. Der Kernrezeptor-Transkriptionsfaktor LXRalpha bindet an die CNRE-Sequenz und mediiert den cAMP-Effekt. Frühere Studien aber zeigten, dass die CNRE-Stelle eine deutliche cAMP-gesteuerte Transaktivierung in Calu-6 Zellen vermittelt, nur wenn LXRalpha überexprimiert ist (Tamura et al., 2004). Deswegen konnte eine Rolle der CNRE Stelle bei der cAMP-abhängigen Stimulation der humanen Renintranskription nicht definitiv ausgeschlossen werden.

3.1.2 Rolle des proximalen CRE-Elements

Als nächstes wurde das im humanen Reninpromotor an der Position -226 bp bis -219 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts +1 bp lokalisierte proximale CRE-Element untersucht, von welchem beschrieben wird, dass es innerhalb eines ~ 900 bp großen humanen Reninpromotors *in vitro* angeblich wichtig für die Regulation des humanen Reningens ist (Ying et al., 1997). Dieses CRE-Element ist nicht im minimalen humanen Reninpromotor enthalten. Um die Bedeutung des proximalen CRE-Elements bei der Regulation der Renin Genexpression genauer aufzuklären, wurde als nächstes die Sequenz des proximalen CRE Elements (TAGCGTCA) vor den minimalen humanen Reninpromotor hRenMin gesetzt, so dass das neu entstandene Konstrukt proxCREhRenMin (Abbildung 3.4) die korrekte Basensequenz des endogenen humanen Reninpromotors trägt.



Abbildung 3.4: Konstrukt proxCREhRenMin mit den cis-Elementen proxCRE, Pa3 und CNRE.

Anschließend wurde das Konstrukt in den Calu-6-Zellen analysiert (Abbildung 3.5).

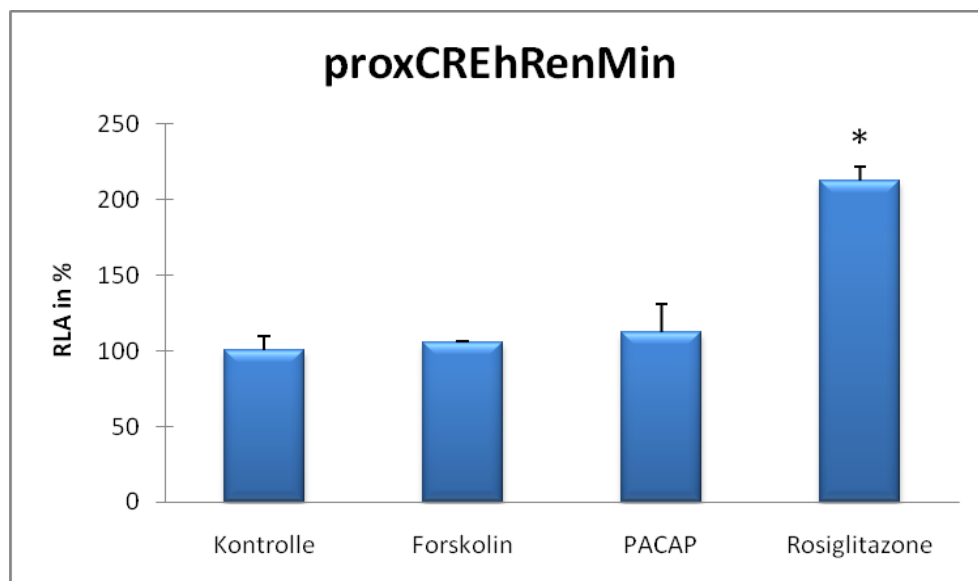


Abbildung 3.5: Renin Promotor-Aktivität in Calu-6-Zellen: Calu-6-Zellen wurden mit dem Konstrukt proxCREhRenMin für 24 h transfiziert und anschließend für 4 h mit Forskolin (5 μ M) und PACAP (300 nM) und 20 h mit Rosiglitazone (500 nM) inkubiert. Die Aktivität der Firefly-Luziferase wurde auf die der Renilla-Luziferase normalisiert (RLA). Die Werte wurden als prozentuale Abweichung zur Kontrolle (100 %) angegeben. Als signifikant gekennzeichnet (*) wurden Werte mit $p < 0,05$.

Abbildung 3.5. zeigt keine Aktivierung des Konstruktes proxCREhRenMin nach Inkubation der Calu-6-Zellen mit Forskolin oder PACAP. Um nachzuweisen, dass das Konstrukt im Prinzip regulierbar ist, wurde parallel zu den cAMP-Agonisten als Positivkontrolle der PPARgamma-Agonist Rosiglitazone zu den Zellen gegeben. Dies führt zu einer Aktivitätssteigerung des Promotors um den Faktor 2,2.

Um sicherzugehen, dass der Verlust der Aktivierung des Konstruktes durch cAMP-Agonisten nicht doch mit einer zufälligen chargenabhängigen Abwesenheit wichtiger trans-aktivierender Faktoren in den Calu-6-Zellen zu begründen ist, wurden die Zellen mit einem Reportergen-Plasmid pCRE-Luc transfiziert, welches die Firefly-Luziferase unter dem Einfluss von zwei hintereinander geschalteten consensus CRE-Elementen trägt (Abbildung 3.6).

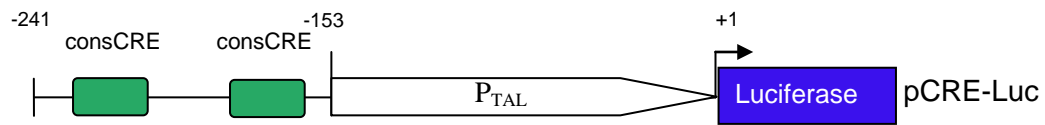


Abbildung 3.6: Konstrukt pCRE-Luc mit den beiden cis Elementen consCRE und dem TATA-like Promotor (P_{TAL}).

Anschließend wurde es in den Calu-6-Zellen analysiert (Abbildung 3.7).

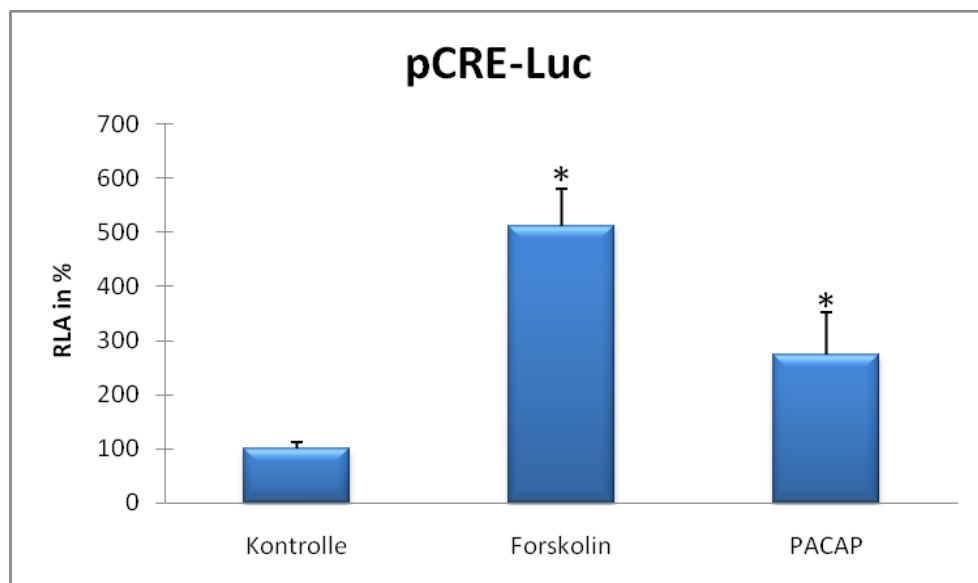


Abbildung 3.7: Renin Promotor-Aktivität in Calu-6-Zellen: Calu-6-Zellen wurden mit dem Konstrukt pCRE-Luc für 24 h transfiziert und anschließend für 4 h mit Forskolin (5 μ M) und PACAP (300 nM) inkubiert. Die Aktivität der Firefly-Luziferase wurde auf die der Renilla-Luziferase normalisiert (RLA). Die Werte wurden als prozentuale Abweichung zur Kontrolle (100 %) angegeben. Als signifikant gekennzeichnet (*) wurden Werte mit $p < 0,05$.

In Abbildung 3.7. lässt sich eindeutig erkennen, dass die Aktivität der Firefly-Luziferase des Plasmids pCRE-Luc in den Calu-6-Zellen durch die cAMP-Agonisten Forskolin oder PACAP signifikant auf das 5-fache (Forskolin) bzw. auf das 2,8-fache (PACAP) ansteigt, was mit einer erhöhten Aktivierung des Promotors zu erklären ist.

Aus Abbildung 3.7 ist ersichtlich, dass das Vorhandensein eines oder mehrerer hintereinander geschalteten CRE-Elemente zu einer Erhöhung der Firefly-Aktivität führt. Hier beinhaltet das Plasmid pCRE-Luc aber das aus der Literatur bekannte consensus CRE-Element, also jenes, an welches CREB am besten bindet. Das Konstrukt proxCREhRenMin trägt aber das im natürlichen Reninpromotor vorkommende proximale CRE-Element. Somit wurde als nächstes die Sequenz des proximalen CRE-Elements (TAGCGTCA) des Konstruktes proxCREhRenMin in die Sequenz des consensus CRE-Elements (TGACGTCA) mutiert, so dass das neu entstandene Konstrukt consCREhRenMin (Abbildung 3.8) die korrekte Basensequenz des in der Literatur beschriebenen consensus CRE-Elements trägt.



Abbildung 3.8: Konstrukt consCREhRenMin mit den cis-Elementen consCRE, Pal3 und CNRE.

Die Analyse der Regulation erfolgte in Calu-6-Zellen (Abbildung 3.9).

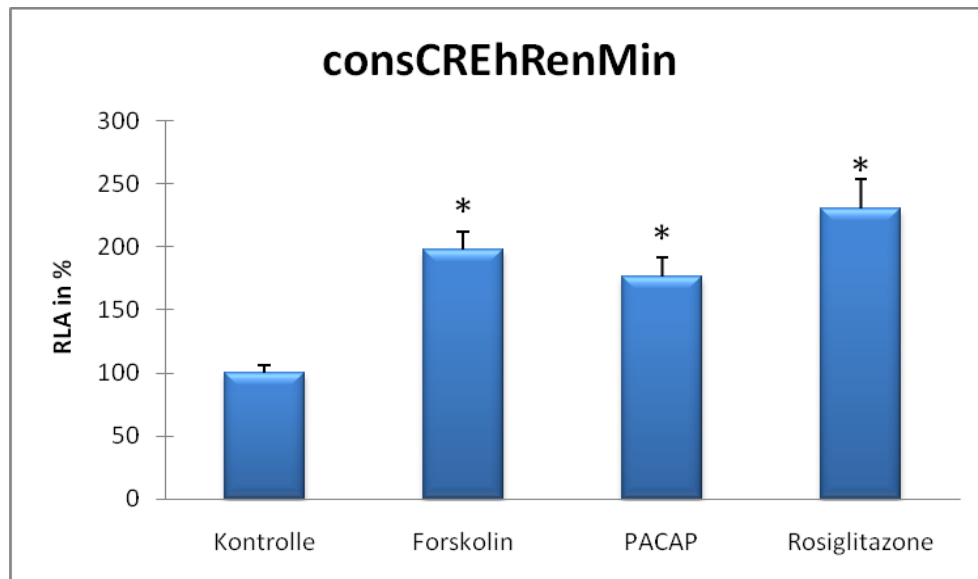


Abbildung 3.9: Renin Promotor-Aktivität in Calu-6-Zellen: Calu-6-Zellen wurden mit dem Konstrukt consCREhRenMin für 24 h transfiziert und anschließend für 4 h mit Forskolin (5 μ M) und PACAP (300 nM) und 20 h mit Rosiglitazone (500 nM) inkubiert. Die Aktivität der Firefly-Luziferase wurde auf die der Renilla-Luziferase normalisiert (RLA). Die Werte wurden als prozentuale Abweichung zur Kontrolle (100 %) angegeben. Als signifikant gekennzeichnet (*) wurden Werte mit $p < 0,05$.

In Abbildung 3.9 lässt sich eindeutig erkennen, dass die Aktivität des Konstrukts consCREhRenMin in Calu-6-Zellen durch die cAMP-Agonisten Forskolin oder PACAP signifikant auf das 2-fache (Forskolin) bzw. auf das 1,8-fache (PACAP) ansteigt. Als Positivkontrolle dient hierbei wieder die Inkubation der transfizierten Zellen mit Rosiglitazone, was zu einer Promotor-Aktivierung auf das 2,3-fache führt.

Aufgrund der Versuche mit den Konstrukten proxCREhRenMin, consCREhRenMin und pCRE-Luc konnte definitiv gesagt werden, dass die Zelllinie Calu-6 und der minimale humane Reninpromotor für die weiteren Versuche nicht geeignet sind. Die transaktivierenden Elemente des cAMP/PKA-Signalweges sind in den Calu-6-Zellen vorhanden und der minimale humane Reninpromotor ist aktivierbar.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass das proximale CRE-Element des humanen Reninpromotors unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht essentiell für die cAMP-abhängige Regulation des Reningens ist.

3.1.3 Rolle des Enhancer CRE-Elements

Die dritte relevante und in dieser Arbeit zu untersuchende cAMP-Zielsequenz des humanen Reninpromotors ist das Enhancer CRE-Element bei ~ -11 kb stromaufwärts des Transkriptionsstartes.

Um die Bedeutung des Enhancer CRE-Elements bei der Regulation der Renin Genexpression in dieser Arbeit genauer aufzuklären, wurde als nächstes die Sequenz des Enhancer CRE Elements (TGACATCA) vor den minimalen humanen Reninpromotor hRenMin gesetzt, so dass das neu entstandene Konstrukt enhCREhRenMin (Abbildung 3.10) die korrekte Basensequenz des Enhancer CRE-Elements trägt.



Abbildung 3.10: Konstrukt enhCREhRenMin mit den cis-Elementen enhCRE, Pal3 und CNRE.

Die Analyse der Regulation erfolgte in Calu-6-Zellen (Abbildung 3.11).

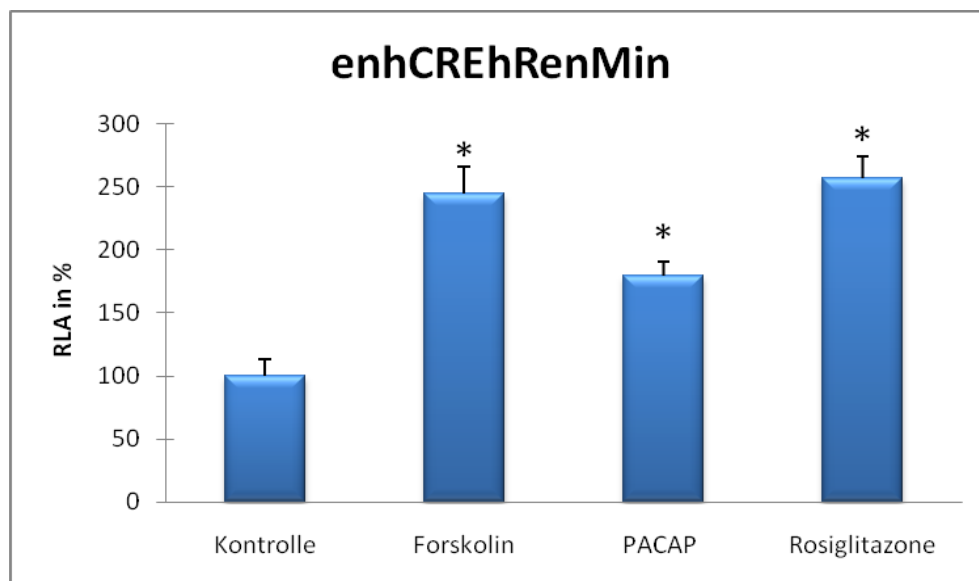


Abbildung 3.11: Renin Promotor-Aktivität in Calu-6-Zellen: Calu-6-Zellen wurden mit dem Konstrukt enhCREhRenMin für 24 h transfiziert und anschließend für 4 h mit Forskolin (5 μ M) und PACAP (300 nM) und 20 h mit Rosiglitazone (500 nM) inkubiert. Die Aktivität der Firefly-Luziferase wurde auf die der Renilla-Luziferase normalisiert (RLA). Die Werte wurden als prozentuale Abweichung zur Kontrolle (100 %) angegeben. Als signifikant gekennzeichnet (*) wurden Werte mit $p < 0,05$.

Abbildung 3.11 zeigt eine signifikante Erhöhung der Aktivität des Konstrukts enhCREhRenMin in den Calu-6-Zellen durch die cAMP-Agonisten Forskolin oder PACAP auf das 2,5-fache (Forskolin) bzw. auf das 1,8-fache (PACAP). Als Positivkontrolle dient hierbei wieder die Inkubation der transfizierten Zellen mit Rosiglitazone, was zu einer Promotor-Aktivierung auf das 2,5-fache führt.

Zusammenfassend lässt sich aus den bisherigen in vitro Experimenten sagen, dass für die cAMP-abhängige Regulation des humanen Renings das proximale Humanrenin-Promotor cis-Element CRE nicht von Bedeutung sind. Hingegen sind die Enhancer CRE-Stelle und wahrscheinlich auch die proximale CNRE-Stelle an der cAMP-abhängigen Regulation des Renings beteiligt.

3.1.4 Funktionelle Relevanz der enhCRE und CNRE Sequenzen in dem Kontext des 12.2 kb Humanreninpromotors

Das Konstrukt hRenLacZ (Abbildung 3.12) beinhaltet ein 12,2 kb großes Reninpromotor-Fragment, welches das Reportergen LacZ (β -Galaktosidase) steuert.

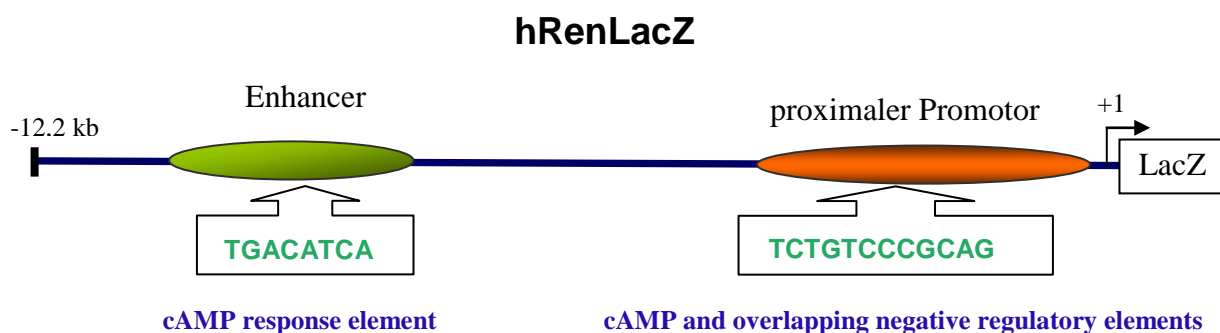


Abbildung 3.12. Konstrukt hRenLacZ. Das Reportergen LacZ wird von einem 12,2 kb großen Reninpromotor-Fragment gesteuert. Im distalen Enhancer befindet sich das Enhancer cAMP response element (CRE) mit der Sequenz TGACATCA, und im proximalen Promotor befindet sich das cAMP and overlapping negative response elements (CNRE) mit der Sequenz TCTGTCCCGCAG.

Aus den Studien von Fuchs et al. (2002) und von Castrop et al. (2006) ging hervor, dass dieses 12,2 kb große humane Reninpromotor-Fragment *in vivo* in den JG-Zellen exprimiert wird und ausserdem regulierbar ist.

Aufgrund der vorangegangenen Versuche dieser Arbeit, bei denen festgestellt wurde, dass das Enhancer CRE-Element und wahrscheinlich die CNRE Stelle für die cAMP-abhängige Regulation des Reningens von Bedeutung sind, wurden beide Elemente im hRenLacZ Konstrukt funktionslos mutiert. Das doppelt mutierte Konstrukt trägt die Bezeichnung hRenMutLacZ (Abbildung 3.13).

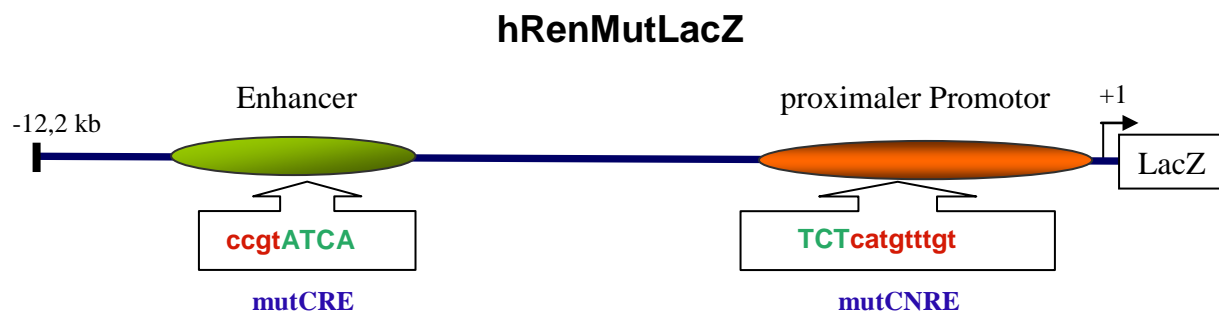


Abbildung 3.13. Konstrukt hRenMutLacZ. Das Reportergen LacZ wird von einem 12,2 kb großen doppelt mutierten Reninpromotor-Fragment gesteuert. Das distale Enhancer cAMP response element (CRE) und das proximale Promotor cAMP and overlapping negative response element (CNRE) wurden mit Hilfe des gerichteten Basenaustausches funktionslos mutiert. Ausgetauschte Basen sind mit Rot gekennzeichnet und klein geschrieben.

Um zu überprüfen, ob einerseits das Konstrukt hRenLacZ cAMP-abhängig regulierbar ist und andererseits die Mutationen im CRE- und CNRE-Element des Konstrukts hRenMutLacZ zu einer Aufhebung des durch intrazelluläre cAMP-Erhöhung induzierten Effektes führen, wurden Transfektions- und Stimulationsmanöver mit der Calu-6-Zelllinie durchgeführt (Abbildung 3.14).

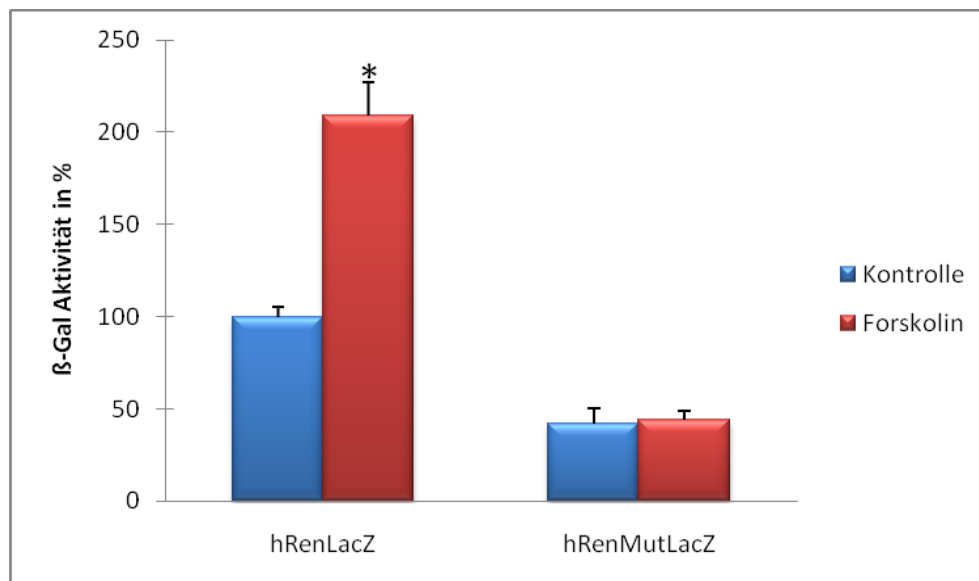


Abbildung 3.14: β -Galaktosidase-Assay in Calu-6-Zellen: Calu-6-Zellen wurden mit dem Konstrukt hRenLacZ oder hRenMutLacZ für 24 h transfiziert und anschließend für 4 h mit Forskolin (5 μ M) inkubiert. Die Menge der β -Galaktosidase wurde auf die Gesamtproteinmenge normalisiert. Die Werte wurden als prozentuale Abweichung zur Kontrolle hRenLacZ (100 %) angegeben. Als signifikant gekennzeichnet (*) wurden Werte mit $p < 0,05$.

Abbildung 3.14 zeigt, dass nach Inkubation der Calu-6-Zellen mit Forskolin die Aktivität des hRenLacZ um den Faktor 2 (rot) im Vergleich zur Kontrolle (blau) zunimmt, was einen zweifach aktiveren Promotor widerspiegelt. Die basale Aktivität des hRenMutLacZ Konstrukts ist um 60 % (blau) geringer und eine Inkubation der mit dem Konstrukt hRenMutLacZ transfizierten Calu-6-Zellen mit Forskolin führt zu keiner Änderung der Promotor-Aktivität (rot), was rückwirkend bedeutet, dass der mutierte Promotor nicht mehr mit einem cAMP-Agonisten aktivierbar ist.

Zusammenfassend lässt sich somit aus dem *in vitro* Versuchsteil sagen, dass die beiden cAMP-Zielsequenzen Enhancer CRE-Element und proximales Promotor CNRE-Element des humanen Reninpromotors bei der Renin Gentranskription von Bedeutung sind und die Mutation der beiden Elemente in dem Konstrukt hRenMutLacZ zu einem Verlust der Induzierbarkeit durch cAMP-Agonisten in der Renin produzierenden Zelllinie Calu-6 führt.

3.2 *in vivo*

3.2.1 Generierung einer transgenen Maus mit dem Transgen hRenMutLacZ

Nach der Aufklärung der Relevanz der beiden cAMP-Zielsequenzen bei der Regulation der Renin Gentranskription *in vitro* wurde als nächstes mit dem Konstrukt hRenMutLacZ die transgene Maus hRenMutLacZ generiert, um die Bedeutung der beiden Sequenzen bei Änderungen in der Renin Gentranskription *in vivo* aufzuklären.

Das Transgen integriert in der Regel nur in einen Locus ins Genom der Maus, dafür aber sehr wahrscheinlich in mehreren Kopien hintereinander. Da nicht bekannt ist, wo das Konstrukt integriert und es durch die Integration eventuell ein anderes Gen ausschaltet, wurden bei der Zucht immer ein LacZ positives Tier mit einem LacZ negativen Tier verpaart, um nur ein LacZ-tragendes Allel im Genom zu haben. Im anderen Allel wäre dann das ausgeschaltete Gen noch aktiv.

Transgen-positive Tiere weisen bei der Genotypisierung eine Bande im 2 % Agarosegel bei 200 bp auf (Abbildung 3.15, unten). Als Positivkontrolle für eine korrekte Genotypisierung wurde ein ~ 600 bp großes endogenes Reningen-Fragment amplifiziert (Abbildung 3.15, oben).

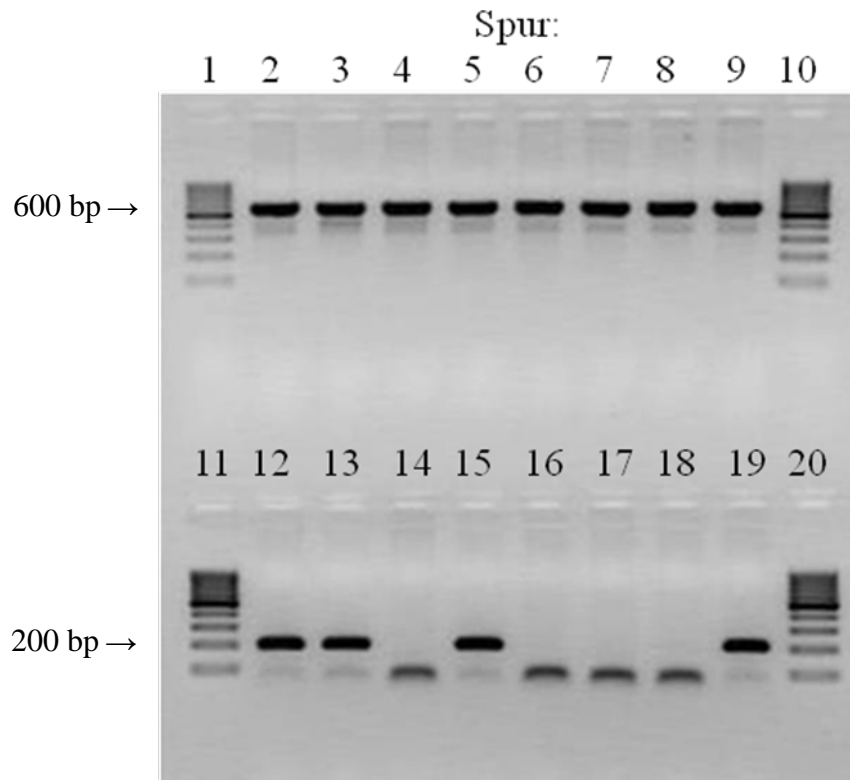


Abbildung 3.15: Genotypisierungs-PCR der F1-Generation des hRenMutLacZ-Stammes. Die Mäuse wurden als Positivkontrolle auf endogenes Renin genotypisiert (Spur 2-9) und in einer zweiten PCR auf das Transgen hRen (Spur 12-19). mRen positive Tiere sind mit einer Bande bei ~ 600 bp gekennzeichnet (oben), hRen positive mit einer Bande bei ~ 200 bp (unten). Spuren 1, 10, 11 und 20: 100 bp-DNA-Molekulargewichtsstandard.

3.2.2 Ko-Lokalisierung der Transgenexpression mit dem endogenem Renin in den JG Zellen der Niere

Fuchs et al. (2002) und Castrop et al. (2006) untersuchten in ihren transgenen Mäusen das gleiche, aber unmutierte 12,2 kb große Humanreninpromotor-Fragment, wie in dieser Arbeit. Beide Gruppen zeigen eindeutige basale Aktivität des Transgens im JG-Zellbereich.

Aufgrund dieser Befunde habe ich zuerst die Niere der hRenMutLacZ Maus auf β -Galaktosidase-Expression hin untersucht.

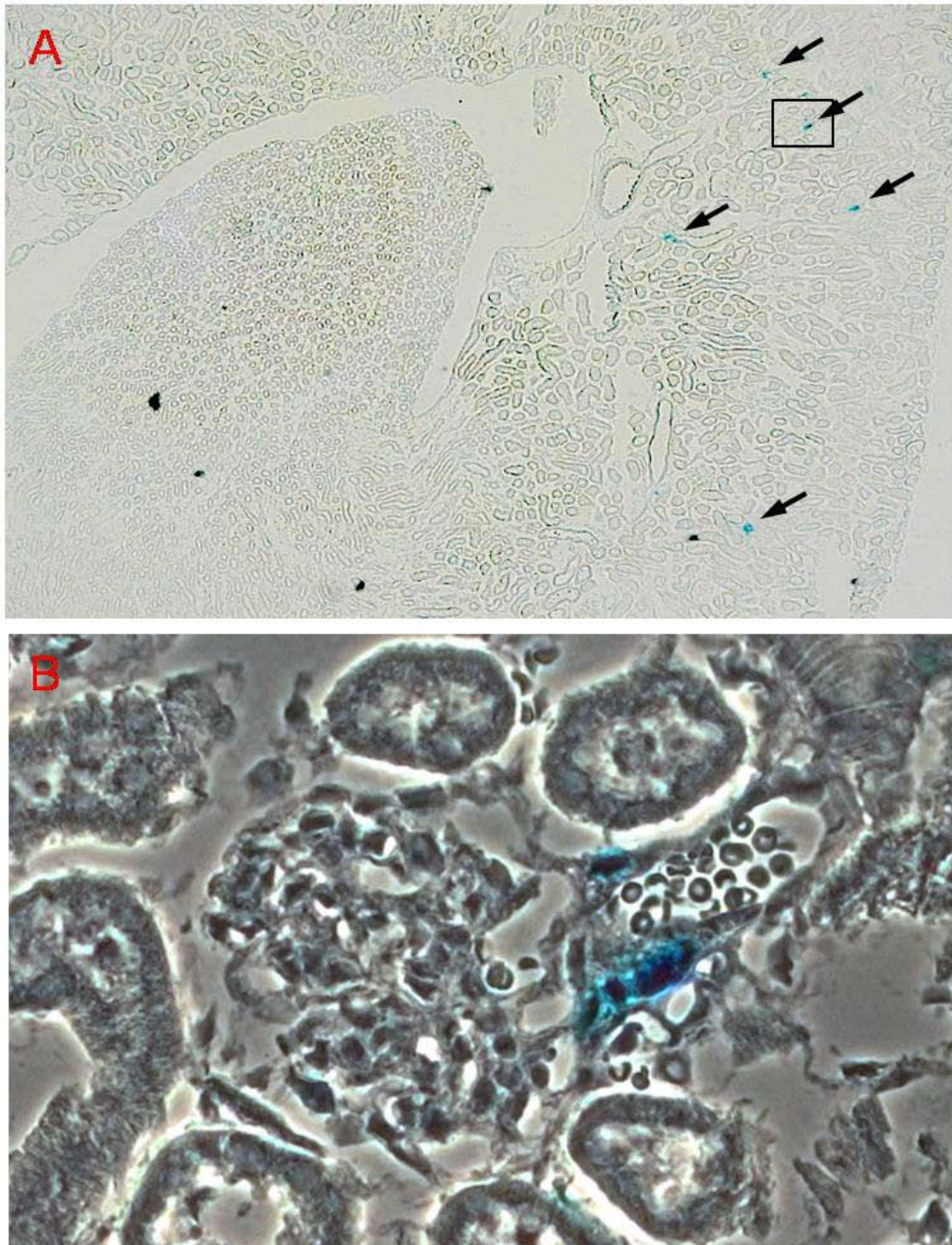


Abbildung 3.16: X-Gal Färbung eines Nierenschnittes der hRenMutLacZ Maus. Der 5 μ M Kryoschnitt wurde für 10 min mit X-Gal-Färbelösung inkubiert. β -Galaktosidase positive Zellen (blau) befinden sich ausschließlich am vaskulären Pol des Glomerulums. Gesamtübersicht bei 50 x Vergrößerung (A, Pfeile deuten positive Glomeruli an), Glomerulum im Detail bei 400 x Vergrößerung (B).

In Abbildung 3.16 ist klar erkennbar, dass nach 10 min Inkubation der Nierenschnitte mit X-Gal eine Färbung am vaskulären Pol des Glomerulums auftritt (A, B). Dies bedeutet, dass in diesen Zellen der Niere, der doppelt mutierte humane Reninpromotor basal so stark aktiv ist, bzw. basal genug β -Galaktosidase aktiv ist, um innerhalb der 10 Minuten eine sichtbare Blaufärbung zu erzeugen.

Als nächstes stellt sich die Frage, ob die Zellen, in denen der humane Promotor aktiv ist, die juxtaglomerulären Zellen sind, in denen auch der endogene murine Reninpromotor aktiv ist (Abbildung 3.17).

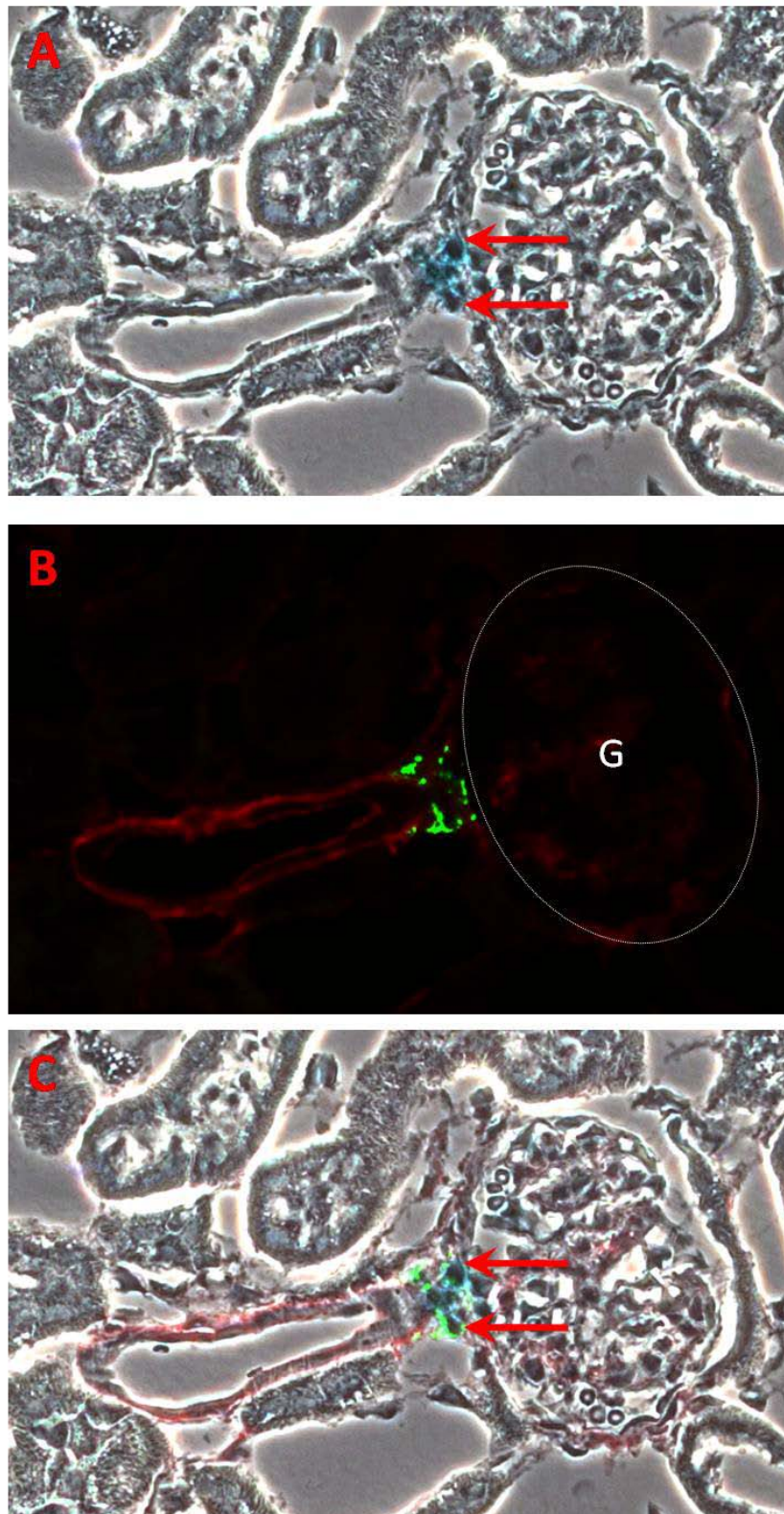


Abbildung 3.17: Färbung von hRenMutLacZ-Nierenschnitten. Der 5 μ M dicke Nierenschnitt wurde enzymatisch mit X-Gal und immunhistochemisch auf α -GM-Aktin und Renin gefärbt. X-Gal-Färbung (blau) ist in A dargestellt (rote Pfeile). Aktin- (rot) und Reninfärbung (grün) in B. Bei Überlagerung der beiden Bilder erkennt man eindeutig, dass manche Zellen sowohl Renin als auch β -Galaktosidase exprimieren (rote Pfeile in C). G: Glomerulum.

In Abbildung 3.17 A ist wie schon in Abbildung 3.16 eine X-Gal-Färbung am vaskulären Pol des Glomerulums zu erkennen. In Abbildung 3.17 B erkennt man in rot dargestellt die immunhistochemische Färbung von α -Glattmuskel-Aktin und in grün die Färbung von Renin. Renin wird nur in den JG-Zellen exprimiert. Überlagert man nachträglich die beiden Aufnahmen, so lässt sich eindeutig erkennen, dass viele JG-Zellen sowohl Renin als auch β -Galaktosidase exprimieren (rote Pfeile in C). Die β -Galaktosidase unseres Konstruktes trägt ein Kern-Translokationselement, weswegen nur die Kerne der Zelle nach X-Gal-Färbung blau gefärbt sind. Da auch die Reninvesikel nicht die komplette Zelle ausfüllen, sieht man auf den Schnitten hin und wieder auch Zellen, die entweder nur X-Gal- oder nur Renin-gefärbt sind, was an der Schnittebene liegt.

Eine 3D-Rekonstruktion (Abbildung 3.18) zeigt eindeutig das Kapillargeflecht des Glomerulums und die afferente Arteriole (rot). Weiterhin erkennt man den JG-Bereich am vaskulären Pol des Glomerulums, da in diesem Bereich eine Renin-Färbung positiv war (grün). Ebenso tritt in diesem Bereich eine X-Gal-Färbung auf, was eine Expression von β -Galaktosidase widerspiegelt (blau). Zwar sind keine Zellgrenzen vorhanden, trotzdem ist ersichtlich, dass je eine Zelle sowohl Renin als auch β -Galaktosidase exprimiert. Diese beiden Färbungen überlagern sich aber nicht, da die β -Galaktosidase im Kern lokalisiert ist, wohingegen Renin in Vesikel, im Zytosol gespeichert ist.

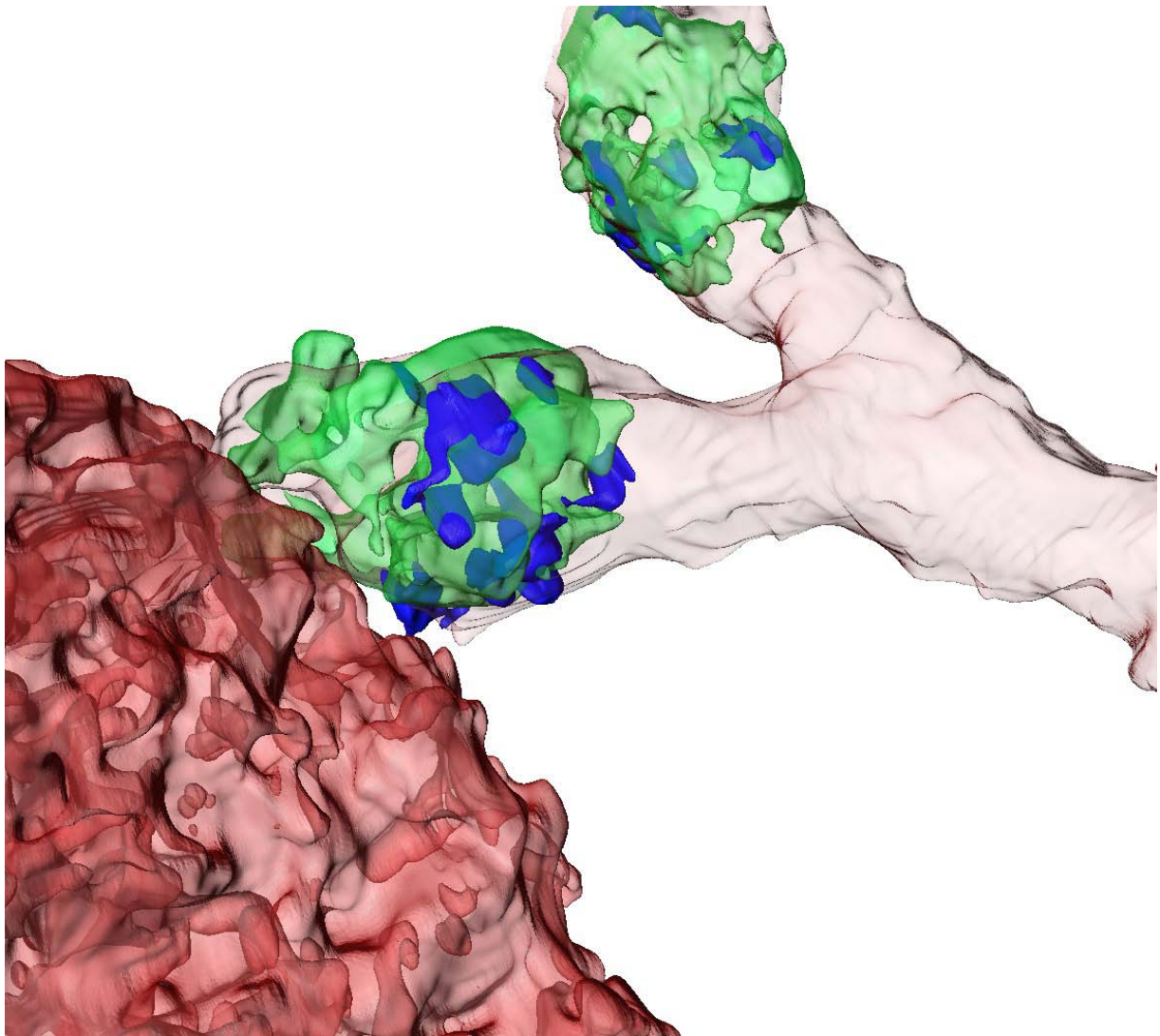


Abbildung 3.18: 3D-Rekonstruktion eines Teils einer hRenMutLacZ-Niere. In Rot sind die afferente Arteriole und das Kapillargeflecht des Glomerulums dargestellt. In Grün ist Renin dargestellt. Blau soll X-Gal-Färbung darstellen, repräsentativ für β -Galaktosidase-Expression. JG-Zellen exprimieren sowohl LacZ als auch Renin.

3.2.3 Expression des Transgens außerhalb der JG-Zellen der Niere

Fuchs et al. (2002) zeigen in ihrer transgenen Maus, die das Reportergen LacZ unter der Kontrolle des 12,2 kb großen Humanreninpromotor-Fragments tragen, auch β -Galaktosidase-Expression in intrarenalen Gefäßen. Diese Färbung ist in unserem Versuchsansatz nicht aufgetreten (Abbildung 3.16 A), was an den Mutationen in CRE und CNRE liegen kann.

Die Tatsache, dass es sich bei der β -Galaktosidase-Färbung um eine enzymatische Reaktion handelt und schon geringe Mengen an Enzym bei Überschuss des Substrates und genügend Inkubationszeit ausreichen um eine starke Reaktion, in diesem Fall Blaufärbung zu erzeugen, ließ uns annehmen, dass Fuchs et al. ihre Schnitte länger mit X-Gal inkubierten. Im Folgenden wurde der Nierenschnitt für 20 h mit X-Gal inkubiert (Abbildung 3.19), um auch geringe Mengen an β -Galaktosidase-Expression in der Niere nachweisen zu können.

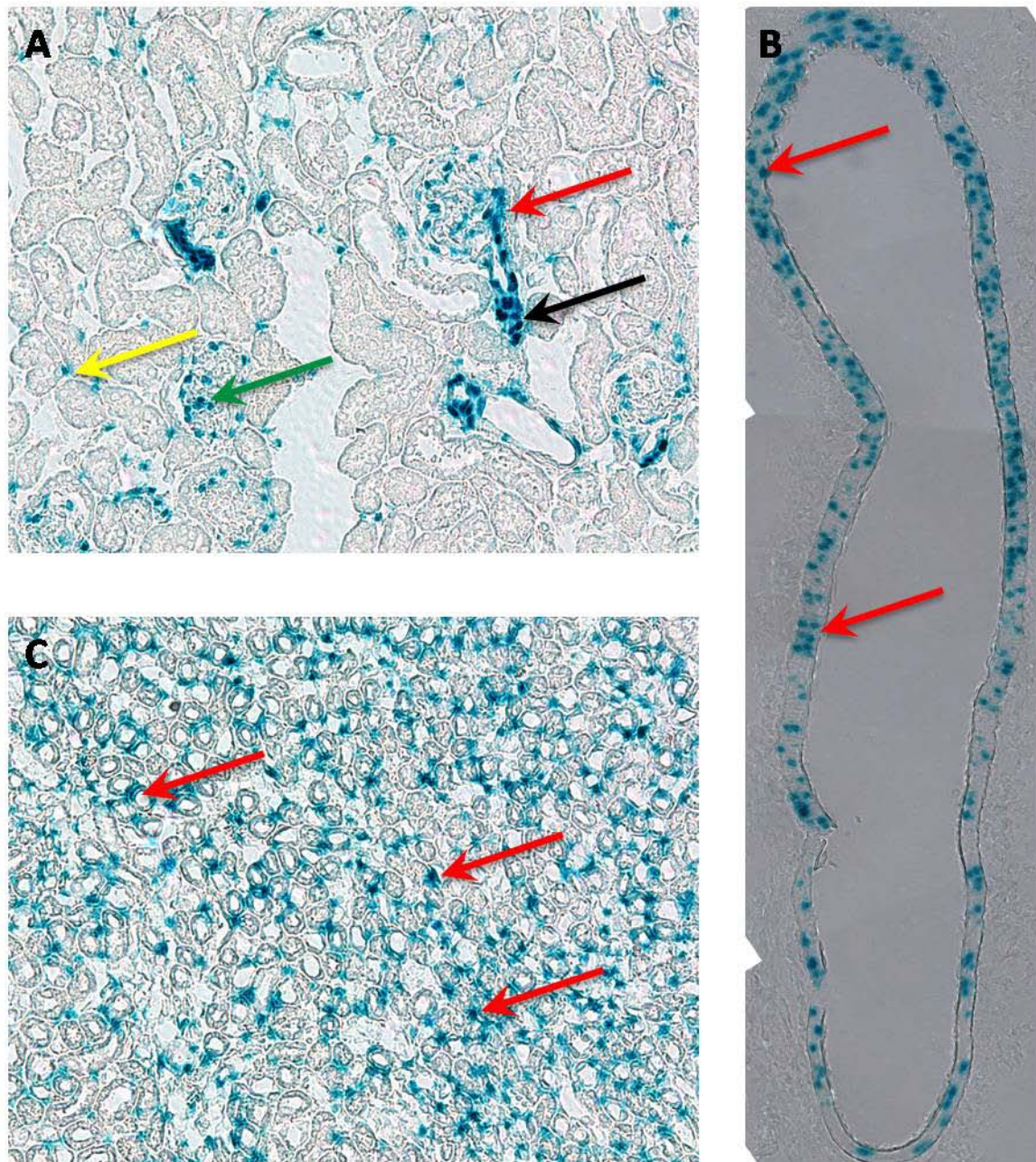


Abbildung 3.19: X-Gal Färbung eines Nierenschnittes der hRenMutLacZ Maus. Der 5 μ M Kryoschnitt wurde für 20 h mit X-Gal-Färbelösung überschichtet. β -Galaktosidase positive Zellen (blaue Punkte) befinden sich am vaskulären Pol des Glomerulums (JG-Bereich (roter Pfeil in A)), im Glomerulum (grüner Pfeil in A), entlang der afferenten Arteriole (schwarzer Pfeil in A), in größeren Gefäßen (roter Pfeil in B) und in interstitiellen Zellen von Medulla (roter Pfeil in C) und Kortex (gelber Pfeil in A). Alle Bilder wurden mit 200 x Vergrößerung aufgenommen, Gefäß (B) wurde nachträglich am Computer aus Einzelbildern zusammengesetzt.

In Abbildung 3.19 ist eine eindeutige, mit Abbildung 3.16 B übereinstimmende starke LacZ-Expression am vaskulären Pol der afferenten Arteriole zu erkennen (A). Zudem erkennt man X-Gal-Färbung entlang der afferenten Arteriole, im Glomerulum, in größeren Gefäßen und in interstitiellen Zellen des Cortex und der Medulla (A, B und C). Man erkennt eindeutig die stärkste Blaufärbung im JG-Zellbereich, was für eine JG-Zell-spezifische Expression des humanen Reninpromotors spricht.

Um auszuschließen, dass die positive X-Gal-Färbung vor allem nach 20 h ausserhalb des JG-Zell-Bereichs aufgrund endogen exprimierter β -Galaktosidase auftritt, wurden 5 μ M dicke Kryoschnitte von Nieren aus Mäusen mit X-Gal gefärbt, die denselben genetischen Hintergrund haben, aber kein Transgen hRenMutLacZ tragen (Abbildung 3.20).

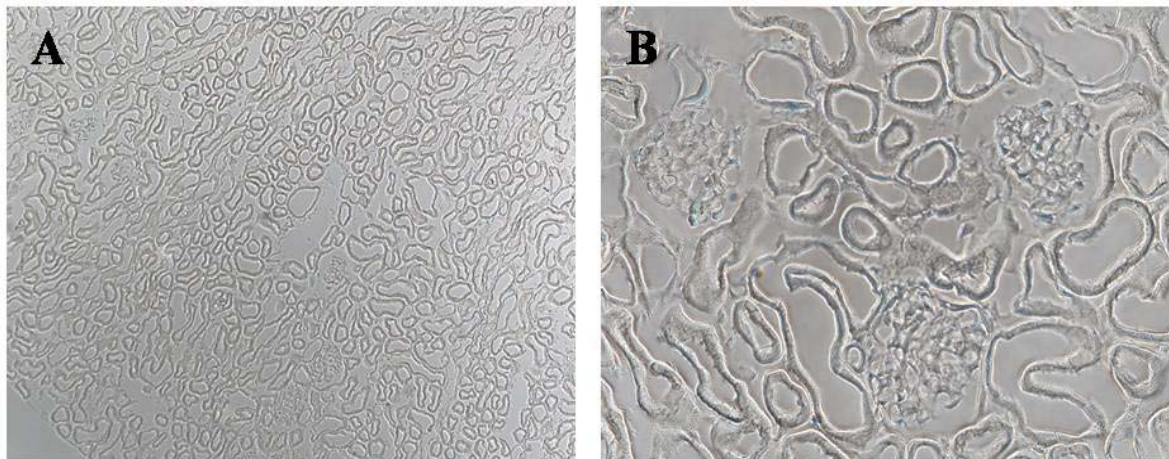


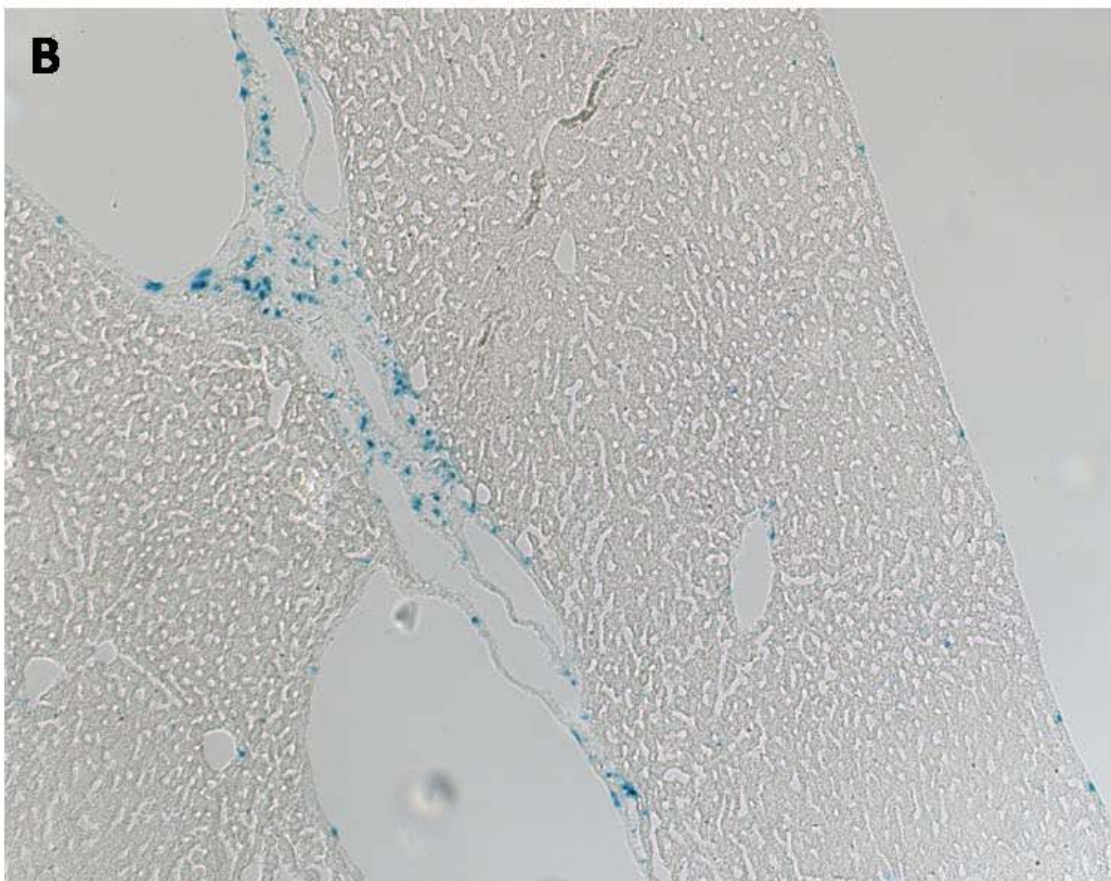
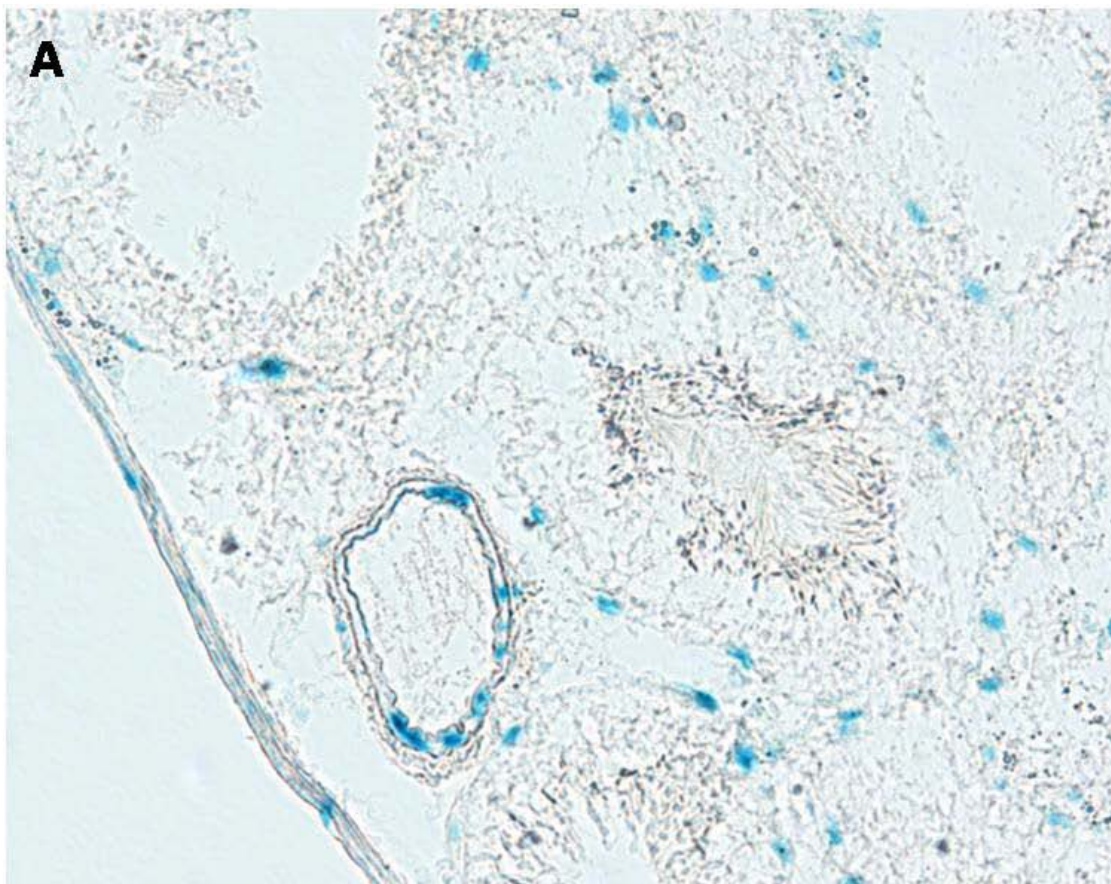
Abbildung 3.20: X-Gal-Färbung von Nieren nicht-transgener Mäuse. Auf dem 5 μ M Kryoschnitt einer Negativkontrolle ist sowohl im Gesamt-Nierenschnitt (A, 100 x), als auch in der Vergrößerung der Glomeruli (B, 400 x) keine endogene X-Gal-Färbung erkennbar.

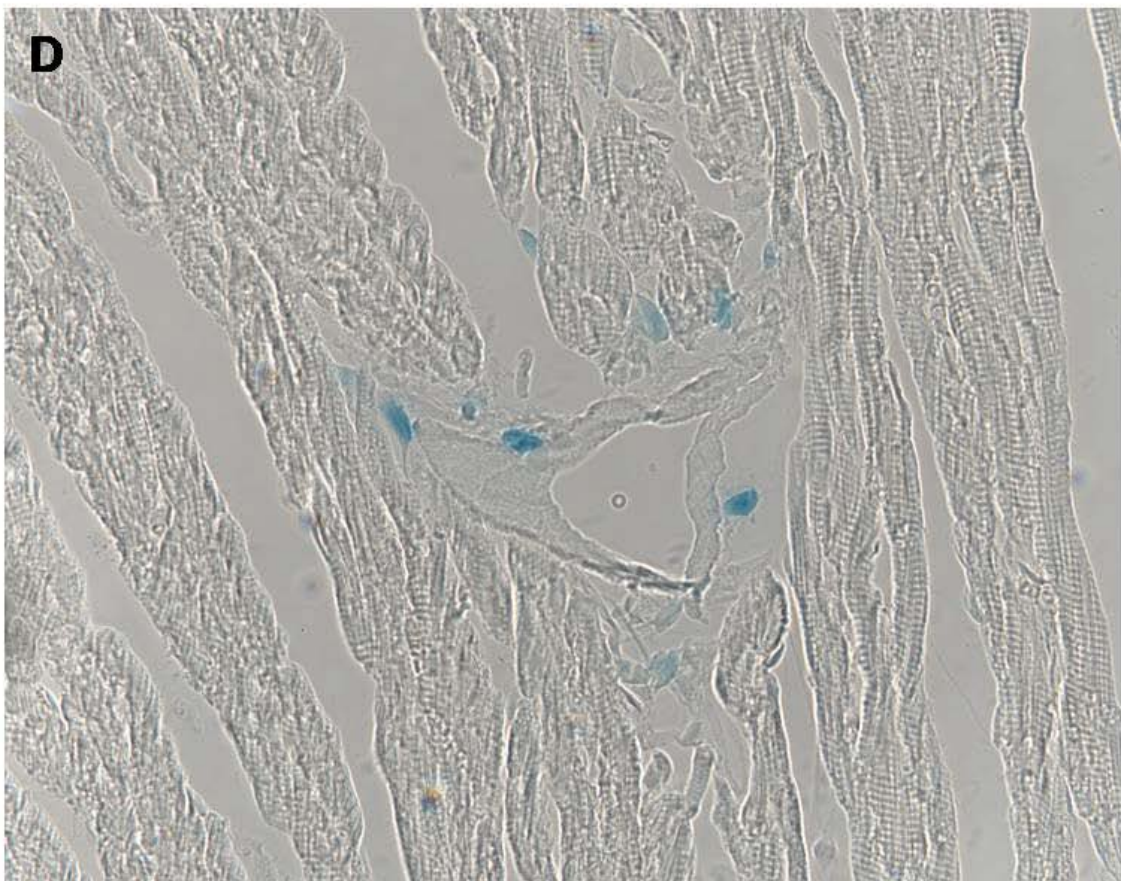
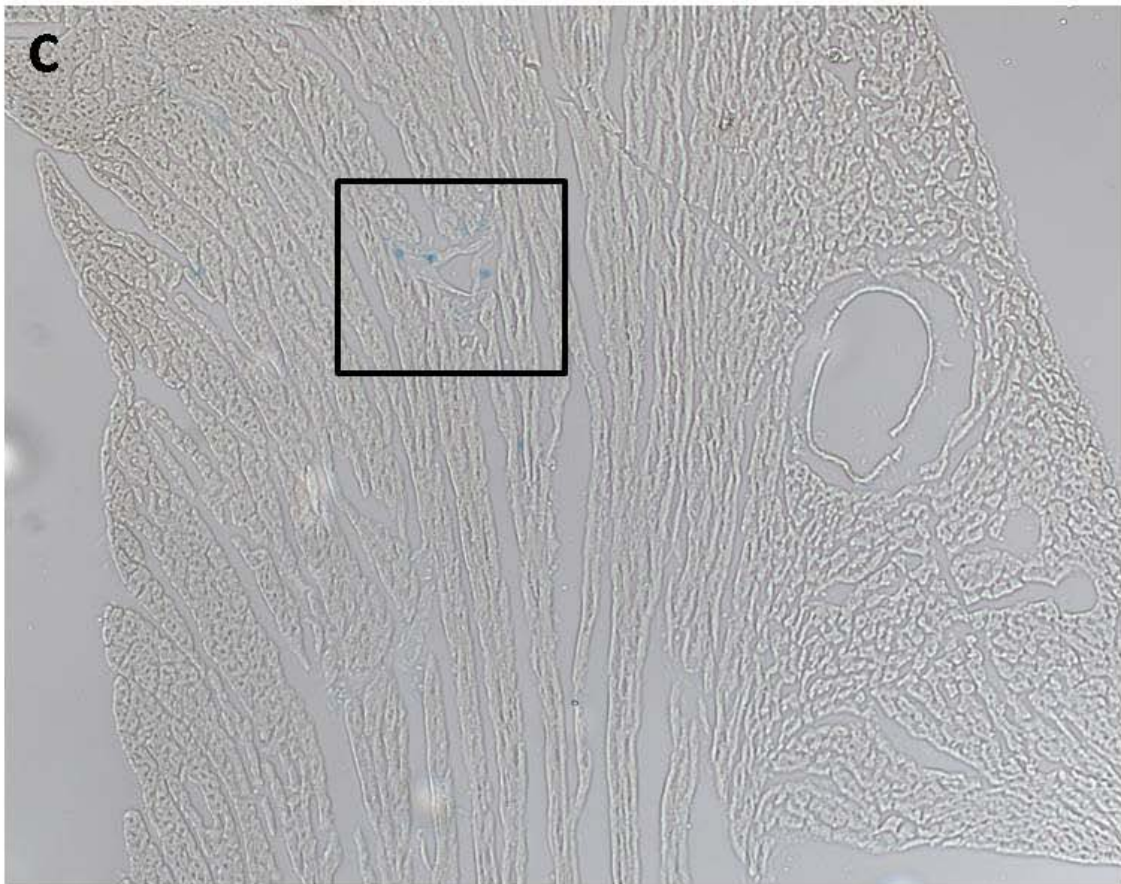
Aus Abbildung 3.20 lässt sich eindeutig schließen, dass die X-Gal-Färbungen in Abbildung 3.19 und in allen anderen Abbildungen aufgrund des Transgens hRenMutLacZ auftreten. Endogen exprimiertes LacZ ist unter unseren Versuchsbedingungen nicht aktiv.

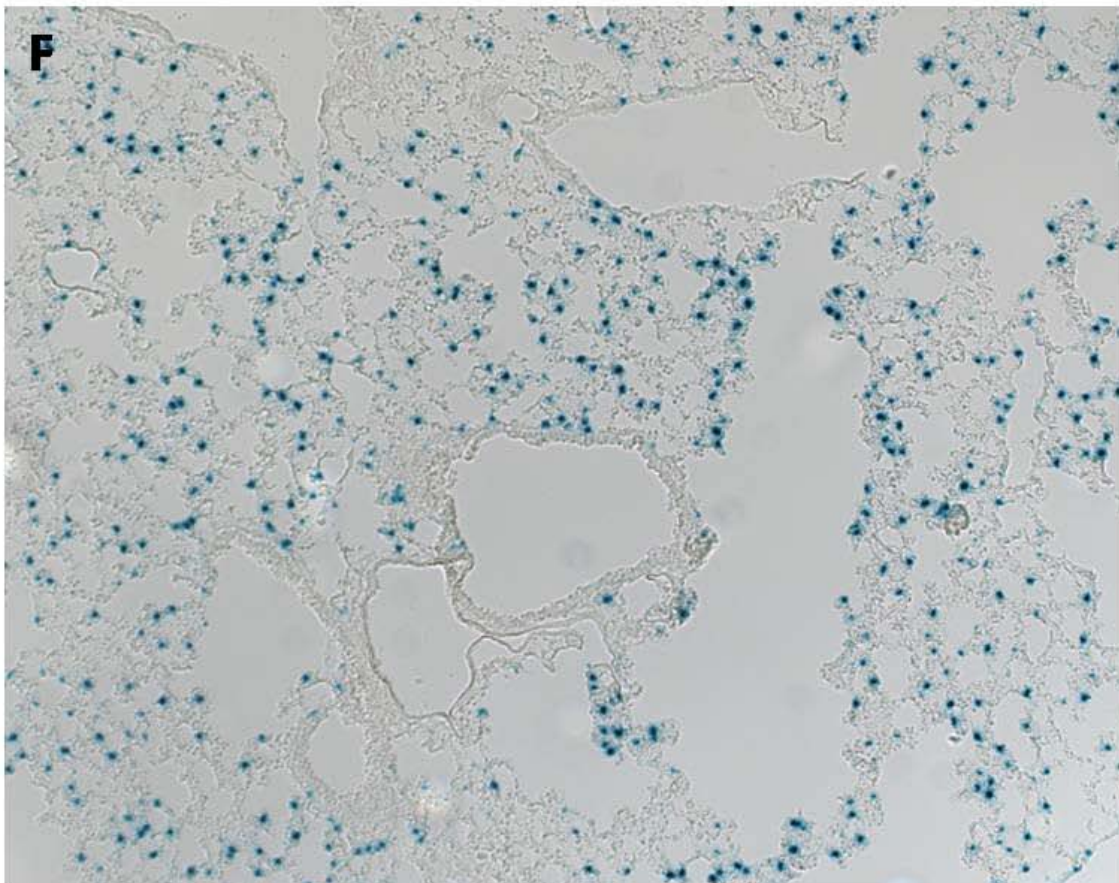
3.2.4 Extrarenale Organe

Da nun bekannt war, dass das mutierte Konstrukt *in vivo* in der Niere aktiv ist, wurden als nächstes extrarenale Organe der hRenMutLacZ-Maus auf β -Gal-Expression untersucht. Aus der Literatur ist bekannt, dass in verschiedenen Organen der Maus lokale Renin-Angiotensin-Systeme vorhanden sind, welche ebenso endogenes Renin, jedoch in viel geringeren Mengen exprimieren (Paul et al., 2006; Bader und Ganter, 2008).

Da davon ausgegangen werden kann, dass auch der mutierte humane Reninpromotor in den extrarenalen Organen schwächer aktiv ist als in den JG-Zellen der Niere, wurden die Schnitte der extrarenalen Organe für 20 h mit X-Gal inkubiert.







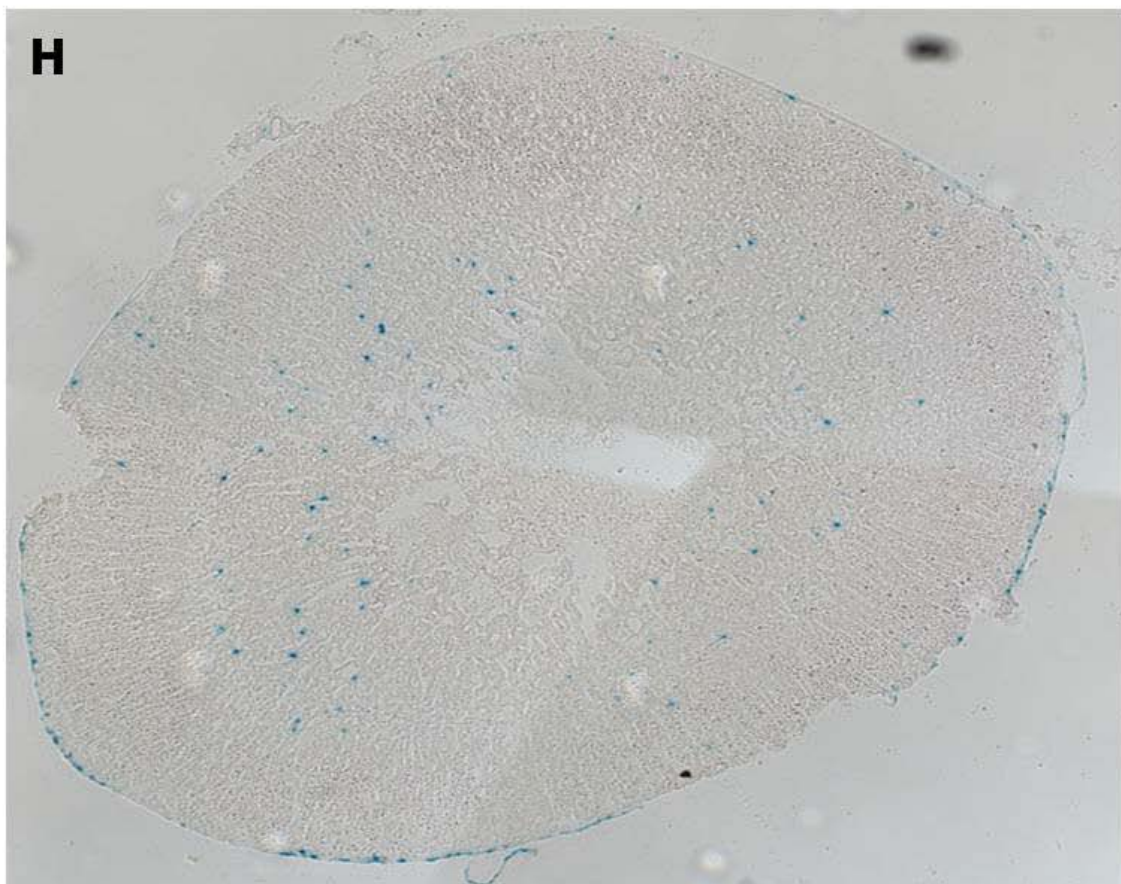
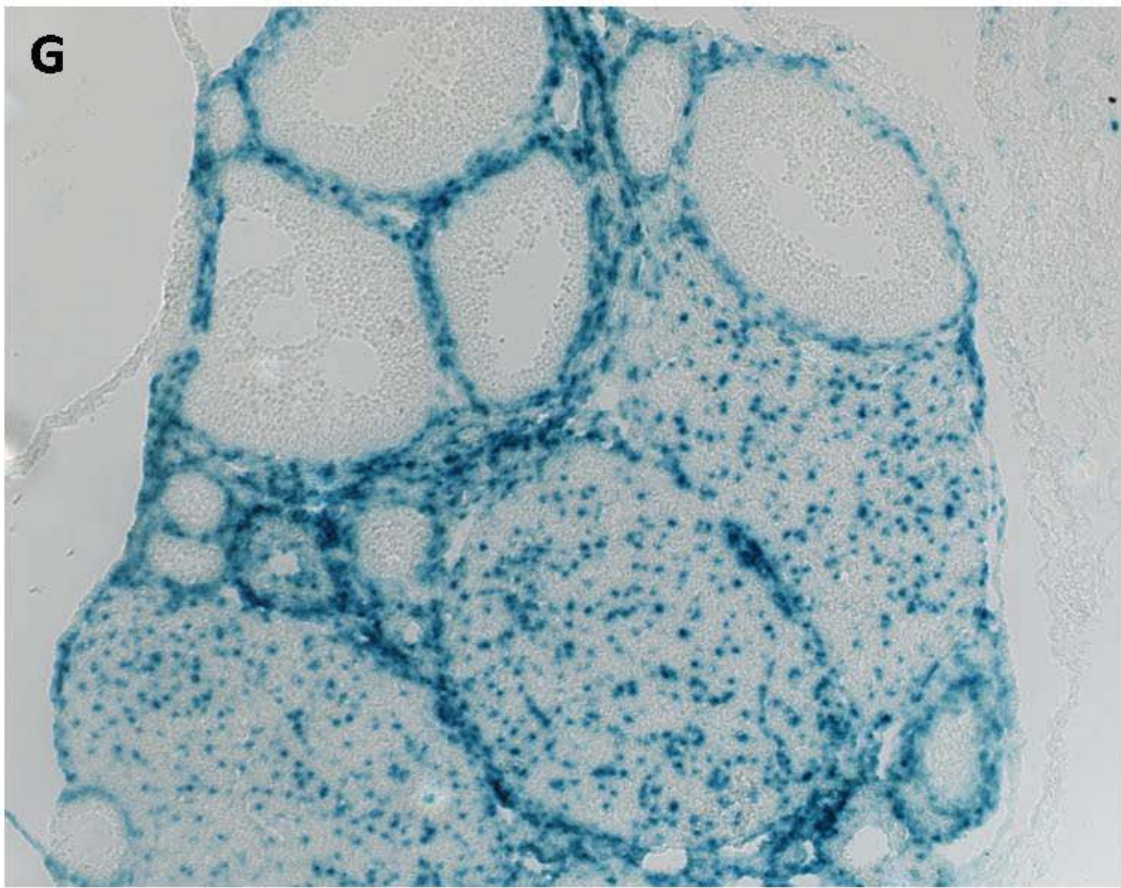


Abbildung 3.21: X-Gal-Färbung extrarenaler Organe der hRenMutLacZ Maus. β -Galaktosidase positive Zellen wurden u.a. in Gefäßen von Testis (A), in den großen Gefäßen und der Kapsel der Leber (B), im Herz (C, 630 x vergrößert in D), im Fettgewebe (E), in der Lunge (F), im Ovar (G) und im Kortex und der Kapsel der Nebenniere (H) gefunden. 200 x Vergrößerung in A, B, C, E, F, G und H.

Wie in Abbildung 3.21 gezeigt, tritt β -Galaktosidase-Expression neben der Niere auch in der Lunge, in den großen Gefäßen der Leber, im Kortex der Nebenniere, im Fettgewebe, im Herz, in Testis und im Ovar auf.

3.2.5 Regulation der Transgenexpression in den JG-Zellen *in vivo*

Aus Versuchsteil 3.2.2 ist bekannt, dass in der Nierenrinde die β -Galaktosidase des Transgens hRenMutLacZ hauptsächlich in den JG-Zellen parallel zum endogenen Renin exprimiert wird. Somit konnte als nächstes untersucht werden, ob das Transgen im Nierenkortex auch parallel zum endogenen Renin reguliert wird.

3.2.5.1 beta-Adrenorezeptor Stimulation

Aus der Literatur ist bekannt, dass Gabe von Isoproterenol zu einer Aktivierung des Reninsystems in der Maus führt (Chen et al., 2006). Isoproterenol ist ein β -Adrenorezeptor Agonist, der über die β 1- (und wahrscheinlich β 2-) Rezeptoren der JG-Zellen den cAMP/PKA Signalweg aktiviert und somit die Renin Gentranskription stimuliert. Da in unserer transgenen Mauslinie zwei aktive cAMP-Zielsequenzen des humanen Renins funktionslos mutiert wurden, sollte der durch Isoproterenol herbeigeführte Effekt auf das Transgen abgeschwächt oder ganz verschwunden sein (Abbildung 3.22).

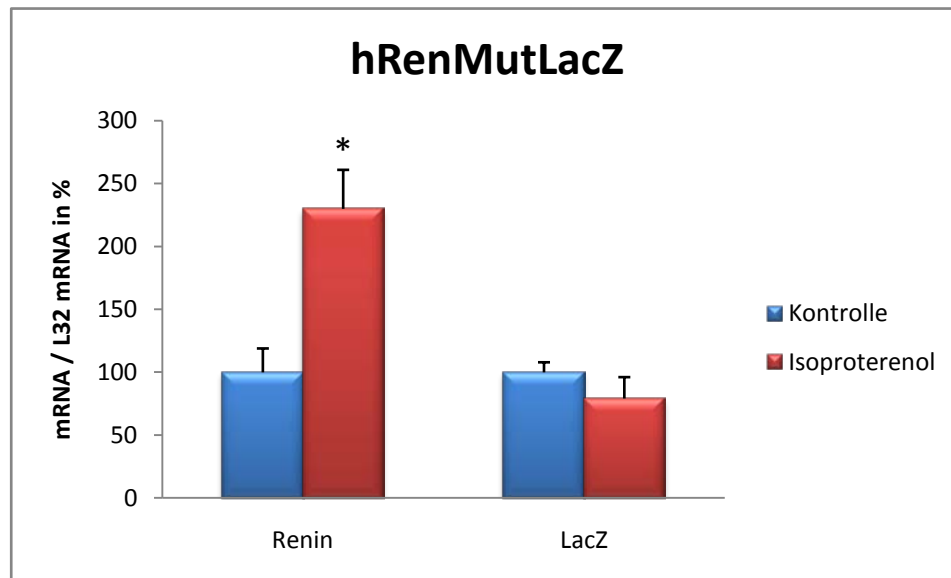


Abbildung 3.22: Den hRenMutLacZ Mäusen wurden für 2 Tage ein Isoproterenol-Pellet oder ein Placebo-Pellet (Kontrolle) subkutan injiziert und anschließend eine Real-Time-PCR der Nieren Gesamt-RNA auf Renin, L32 und LacZ durchgeführt. Renin mRNA und LacZ mRNA wurden auf das Haushaltsgen L32 normalisiert. Die Kontrollen für Renin mRNA und LacZ mRNA wurden unabhängig voneinander auf 100% gesetzt. Als signifikant gekennzeichnet (*) wurden Werte mit $p < 0,05$.

Abbildung 3.22 zeigt deutlich, dass nach Applikation von Isoproterenol (rot) für zwei Tage die Renin mRNA-Abundanz im Vergleich zur Kontrolle (blau) auf das 2,3 fache zunimmt. Die Isoproterenol-Applikation bewirkt keinen Effekt auf die LacZ mRNA Expression.

3.2.5.2 Angiotensin II-gesteuerte Regulation des Transgens

Angiotensin II (Ang II) hemmt die Renin Gentranskription (siehe Einleitung). Eine Änderung der systemischen Ang II Konzentration durch z.B. Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-Inhibitoren oder Ang II AT_{1a}-Blocker stimuliert die Expression des Reningens.

Um das Reninsystem der hRenMutLacZ Mäuse zu stimulieren, wurden die Tiere mit Enalapril behandelt (Abbildung 3.23).

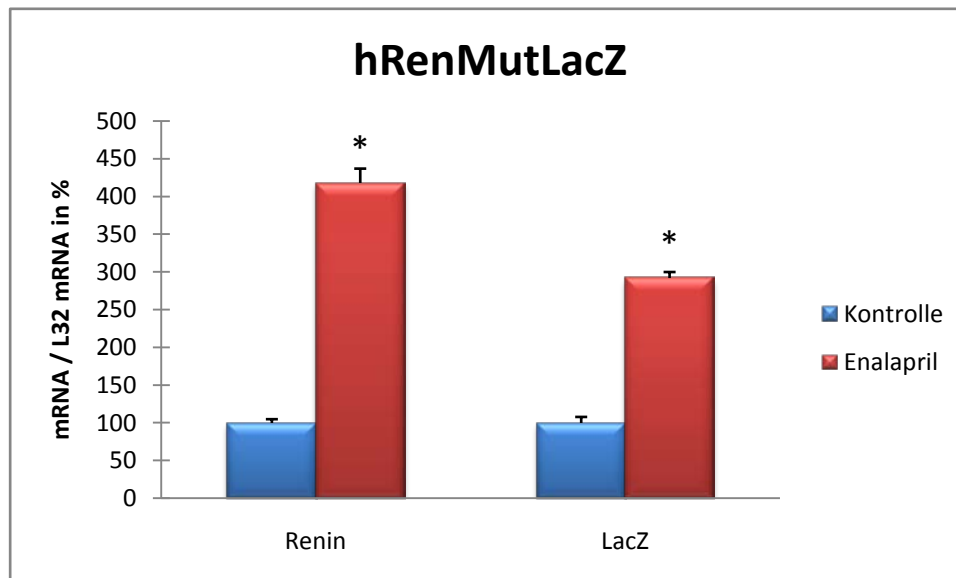


Abbildung 3.23: Die hRenMutLacZ Mäuse wurden für 7 Tage mit Enalapril-haltigem Wasser (Enalapril; 10 mg/kg/Tag, rot) oder normalem Wasser (Kontrolle, blau) behandelt. Anschließend wurde eine Real-Time-PCR der Nieren Gesamt-RNA auf Renin, L32 und LacZ durchgeführt. Renin mRNA und LacZ mRNA wurden auf das Haushaltsgen L32 normalisiert. Die Kontrollen für Renin mRNA und LacZ mRNA wurden unabhängig voneinander auf 100% gesetzt. Als signifikant gekennzeichnet (*) wurden Werte mit $p < 0,05$.

Aufgrund Abbildung 3.23 kann definitiv ausgeschlossen werden, dass das Konstrukt hRenMutLacZ nicht regulierbar ist. Gabe von Enalapril erhöhte die mRNA Abundanz von Renin (auf das 4,2 fache) und von LacZ (auf das 2,8 fache).

Die Wirkung des ACE-Inhibitors Enalapril lässt sich nicht nur molekularbiologisch, sondern auch immunhistochemisch nachweisen. Aus der Literatur ist bekannt, dass hierbei Renin bildende Zellen in der afferenten Arteriole der Niere rekrutiert werden (Sequeira Lopez et al., 2001), welche nach Antikörperfärbung im Fluoreszenzmikroskop klar erkennbar sind (Abbildung 3.24).

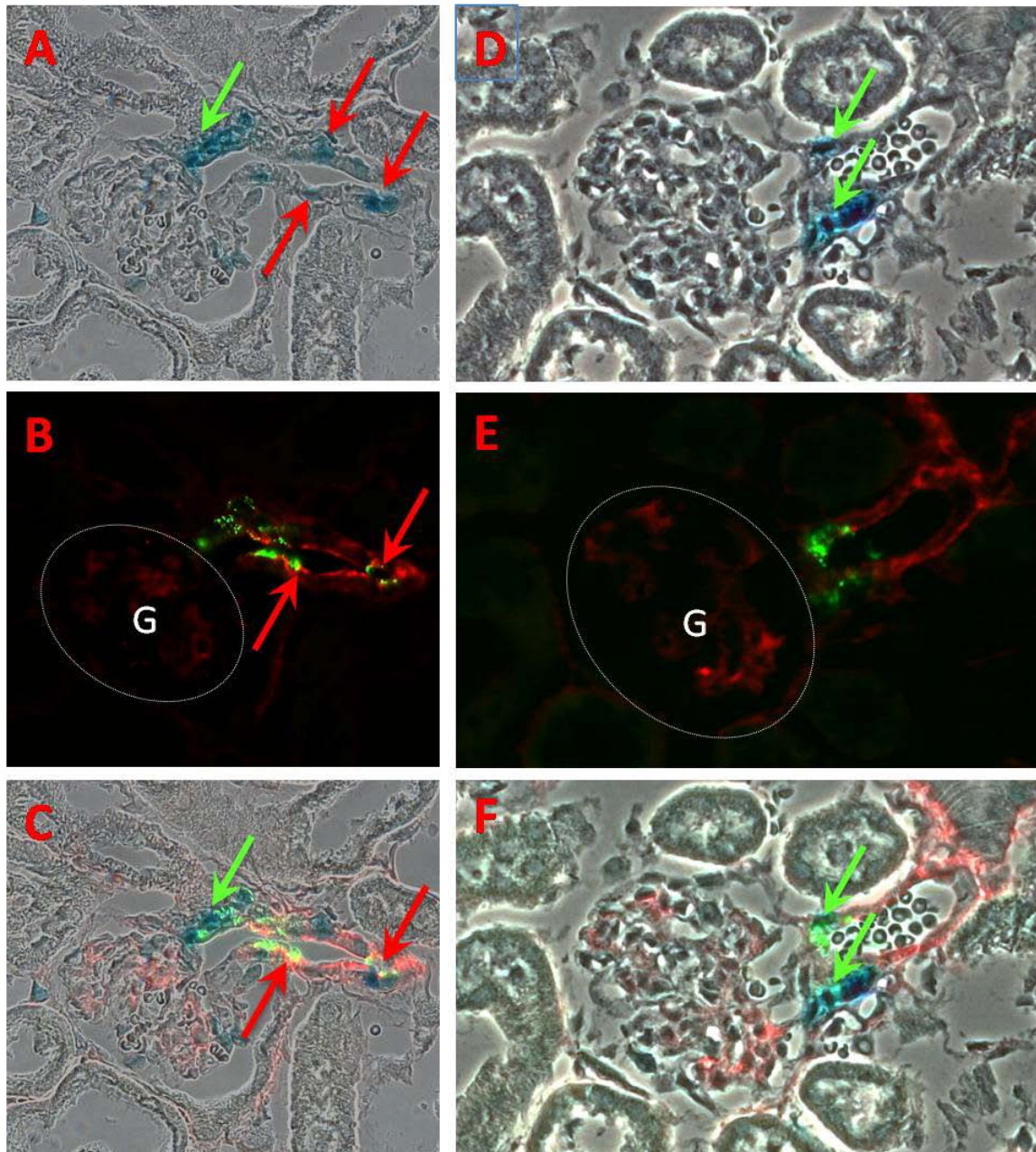


Abbildung 3.24: Färbung von Nierenschnitten von mit Enalapril (A, B, C, links) und unbehandelten (D, E, F) hRenMutLacZ Mäusen. Die 5 μ M dicken Nierenschnitte wurden enzymatisch mit X-Gal und immunhistochemisch auf α -GM-Aktin und Renin gefärbt. X-Gal-Färbung (blau) ist in A (Enalapril) und D (Kontrolle) dargestellt. Aktin- und Reninfärbung in B (Enalapril) und E (Kontrolle). Bei Überlagerung der beiden Bilder erkennt man eindeutig, dass manche Zellen sowohl Renin als auch β -Galaktosidase exprimieren (C (Enalapril) E (Kontrolle)). Rekrutierung ist eindeutig zu erkennen (rote Pfeile in A, B und C). Grüne Pfeile zeigen gewohnte Färbung am vaskulären Pol des Glomerulums. G: Glomerulum.

Abbildung 3.24 zeigt eindeutig die Rekrutierung von Renin (A) und LacZ (B) bildenden Zellen (rote Pfeile in A und B). Bei Überlagerung von Lichtbild und Fluoreszenzbild erkennt man, dass die rekrutierten Zellen beide Gene exprimieren (rote Pfeile in C). Diese Tatsache unterstreicht erneut, dass das mutierte Konstrukt hRenMutLacZ, ähnlich zum endogenen Renin, durch ACE Hemmung regulierbar ist. Diese Rekrutierung ist auch auf Gesamtnierenschnitten zu erkennen. Alle Glomeruli einer Niere besitzen am vaskulären Pol aktive Renin bildende Zellen. Da aber aufgrund des 5 μ M Schnittes und dessen Schnittebene nicht alle Glomeruli in der Immunhistochemie positive Signale zeigen, scheint es so, als ob einige Glomeruli keine JG-Zellen besitzen. Kommt es nun durch Enalapril-Behandlung der Maus zu einer Rekrutierung von Renin bildenden Zellen, so ist die Wahrscheinlichkeit größer, mit einem Schnitt mehrere Renin-positive Glomeruli nachzuweisen. Untersucht man in diesem Fall unter einem Lichtmikroskop die β -Galaktosidase Expression, so erkennt man auf einem Nieren-Schnitt einer mit Enalapril behandelten Maus mehrere LacZ-positive Glomeruli als in einer Kontrollmaus (Abbildung 3.25).

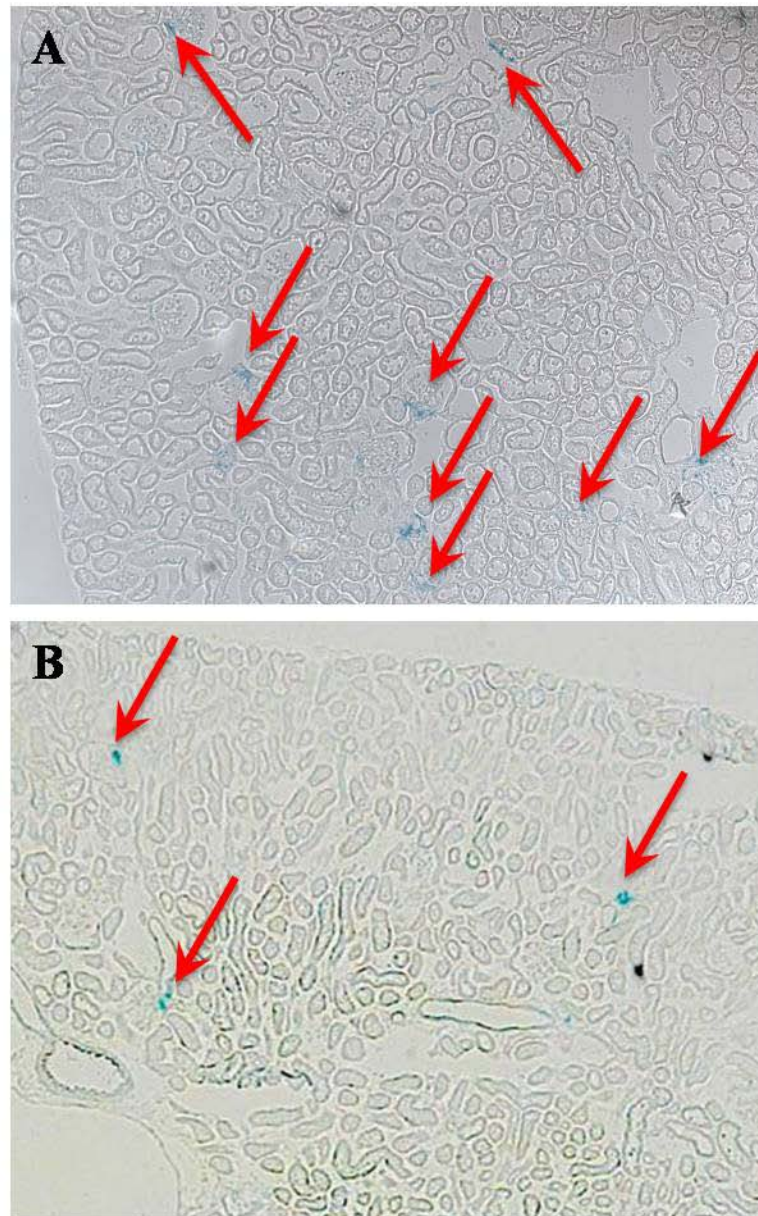


Abbildung 3.25: X-Gal Färbung zweier Nierenschnitte der hRenMutLacZ Maus. A: Nierenschnitt einer mit Enalapril behandelten hRenMutLacZ-Maus, B: Nierenschnitt einer unbehandelten hRenMutLacZ-Maus. Der 5 μ M Kryoschnitt wurde für 10 min mit X-Gal-Färbelösung inkubiert. A und B bei 100 x Vergrößerung. Gefärbte Glomeruli mit rotem Pfeil gekennzeichnet.

Eine Auszählung von LacZ-positiven Glomeruli von 5 μ M dicken Schnitten aus Enalapril-behandelten (n=4) und unbehandelten (n=4) Mäusen ergab folgende Grafik (Abbildung 3.26).

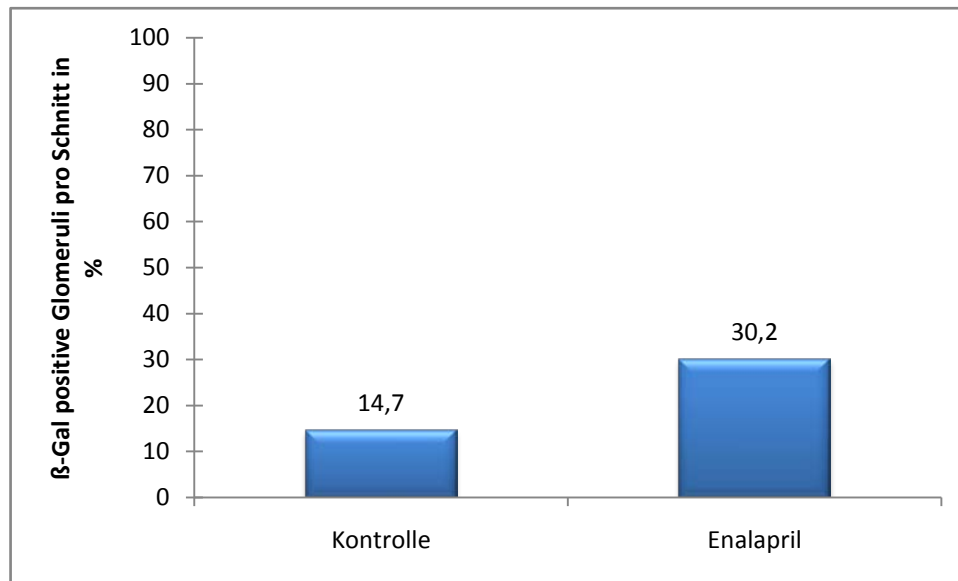


Abbildung 3.26: Prozentualer Anteil an X-Gal gefärbten Glomeruli pro Schnitt. 5 μ M-Nieren-Kryoschnitte von unbehandelten (Kontrolle, n=4) und mit Enalapril behandelten Mäusen (n=4) wurden für 10 min mit X-Gal gefärbt und nachträglich unterm Lichtmikroskop ausgezählt. 100 %: alle Glomeruli pro Schnitt gefärbt.

3.2.5.3 Transgenexpression in AT_{1a} Knockout Mäusen

Sugaya et al. 1995 und Machura et al. 2009 zeigten unter anderem, dass der Knockout des Ang II Rezeptors Typ 1a im adulten Tier zu einer Erhöhung des Renin mRNA Levels führt. Ausserdem zeigte die Arbeitsgruppe um Machura mit Hilfe der Immunhistochemie, dass Renin bildende Zellen entlang der afferenten Arteriole rekrutiert werden, und Renin bildende Zellen am vaskulären Pol des Glomerulums und entlang der afferenten Arteriole angelagert werden.

Eine Kreuzung dieser AT_{1a} Knockout Maus mit der hRenMutLacZ Maus sollte zusätzlich zu der pharmakologischen Blockade der Ang II Bildung über eine transgene Methode zeigen, ob die Expression des Transgens durch Ang II ähnlich zum endogenen Renin reguliert wird.

Für die Zucht des neu generierten Mausstammes hRenMutLacZ AT_{1a}^{-/-} wurde eine F1-Generation LacZ⁺AT_{1a}^{+/-} Maus mit einer F1-Generation LacZ⁻AT_{1a}^{+/-} Maus gekreuzt und eine Genotypisierungs-PCR auf den transgenen humanen Reninpromotor (hRen) und auf den AT_{1a}-Rezeptor durchgeführt. (Abbildung 3.27).

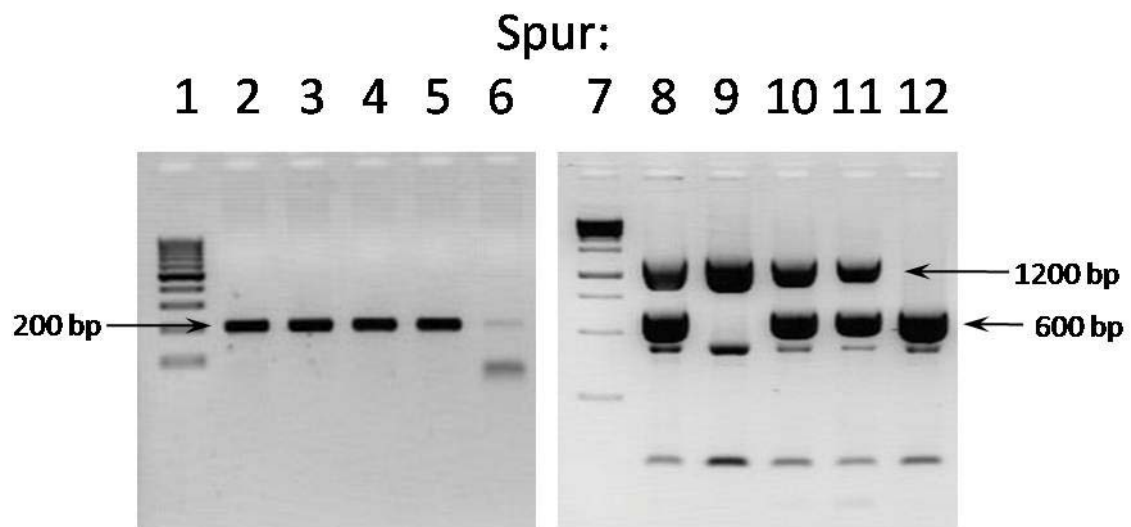


Abbildung 3.27: Genotypisierungs-PCR der F2-Generation des hRenMutLacZ $AT_{1a}^{-/-}$ -Stammes. 5 Mäuse wurden auf das Transgen hRen (Spuren 2-6) und auf den Angiotensin II Rezeptor Typ 1a (AT_{1a}) genotypisiert (Spuren 8-12). hRen positive Tiere sind mit einer Bande bei ~ 200 bp gekennzeichnet. Wildtyp AT_{1a} -Bande ist bei ~ 600 bp, Knockout AT_{1a} -Bande bei ~ 1200 bp. Spuren 2/8, 3/9, 4/10, 5/11, 6/12: Genotypisierungen von jeweils einem Tier. Spur 1: 100 bp-DNA-Molekulargewichtsstandard, Spur 7: 1 kb-DNA-Molekulargewichtsstandard.

Von einer hRenMutLacZ $AT_{1a}^{-/-}$ -Maus sollte nun eine Färbung eines Nierenschnittes angefertigt werden, um zu sehen, ob die rekrutierten oder angelagerten Renin bildenden Zellen ebenso LacZ exprimieren (Abbildung 3.28).

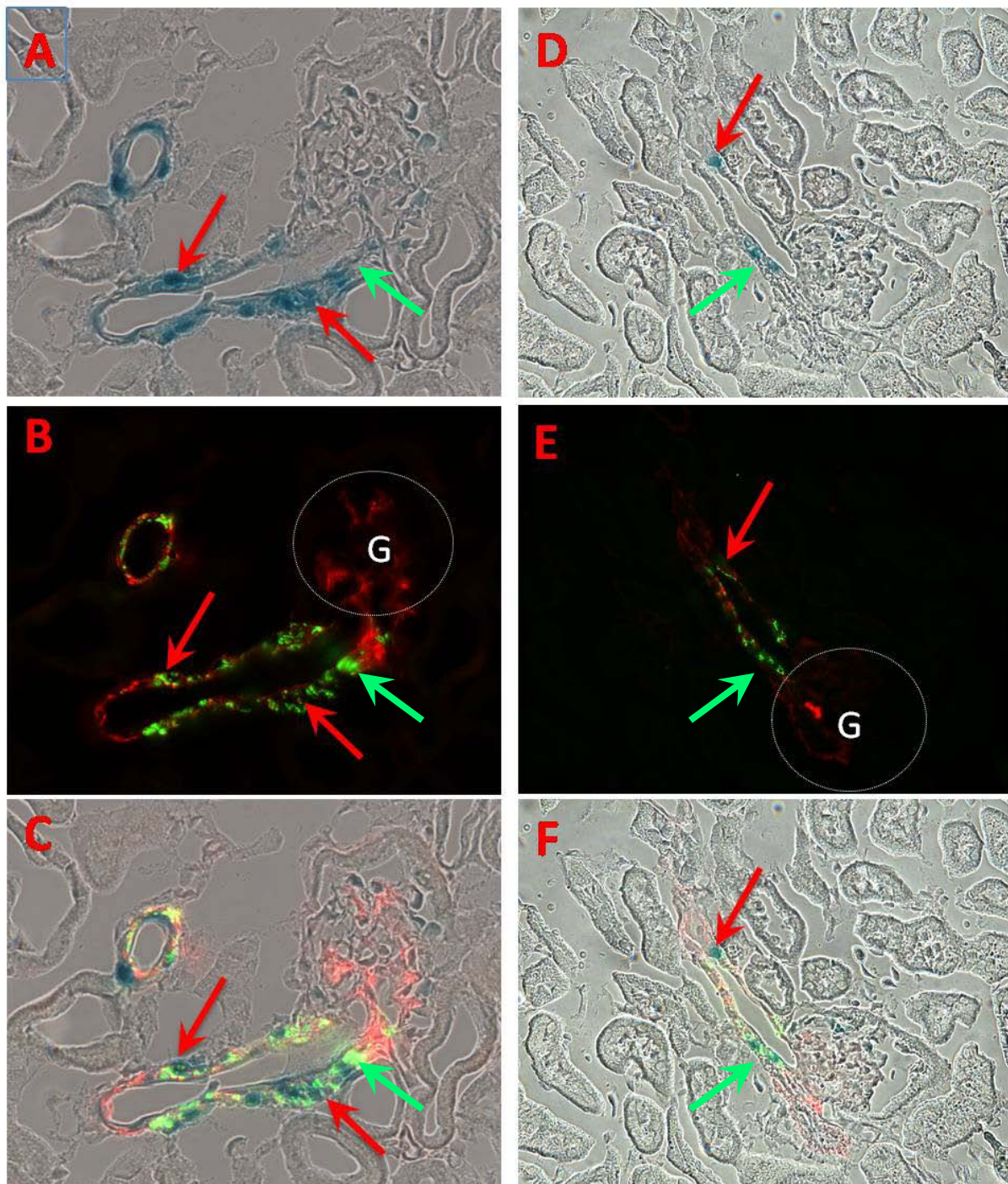


Abbildung 3.28: Färbung von Nierenschnitten von hRenMutLacZ $AT_{1a}^{-/-}$ (A, B, C) und als Kontrolle mit Enalapril behandelten hRenMutLacZ Mäusen (D, E, F). Die 5 μ m dicken Nierenschnitte wurden enzymatisch mit X-Gal und immunhistochemisch auf α -GM-Aktin und Renin gefärbt. X-Gal-Färbung (blau) ist in A und D dargestellt. Aktin- und Reninfärbung in B und E. In A und B (rote Pfeile) ist eine Rekrutierung LacZ- und Renin-exprimierender Zellen erkennbar. Bei Überlagerung der beiden Bilder erkennt man eindeutig, dass rekrutierte und angelagerte Zellen sowohl Renin als auch β -Galaktosidase exprimieren (rote Pfeile in C und F) Grüne Pfeile in zeigen Renin- und LacZ-Expression im JG-Bereich. G: Glomerulum.

In Abbildung 3.28 A ist eine X-Gal-Färbung am vaskulären Pol des Glomerulums und in Zellen entlang der afferenten Arteriole zu erkennen. In Abbildung 3.28 B erkennt man in rot dargestellt die immunhistochemische Färbung von Glattmuskel-Aktin und in grün die Färbung von Renin. Renin wird in den JG-Zellen und zusätzlich, wie erwartet, in rekrutierten Zellen der afferenten Arteriole exprimiert. Ausserdem wird es in angelagerten Zellen am vaskulären Pol des Glomerulums exprimiert. Überlagert man nachträglich die beiden Aufnahmen, so lässt sich eindeutig erkennen, dass viele JG-Zellen sowohl Renin als auch β -Galaktosidase exprimieren (grüne Pfeile in 3.28 C). Es lässt sich auch erkennen, dass manche rekrutierte und angelagerte Zellen sowohl Renin als auch β -Galaktosidase exprimieren (rote Pfeile in C). Da die β -Galaktosidase nach der Expression in den Kern transloziert wird, und da die Reninvesikel nicht die komplette Zelle ausfüllen, gibt es hin und wieder auch Zellen, die entweder nur X-Gal- oder nur Renin-gefärbt sind, was an der Schnittebene liegt.

Auch hier erkennt man, wie schon in mit Enalapril behandelten Mäusen (Abbildung 3.24 A, B, C; Abbildung 3.28 D, E, F), dass durch die Rekrutierung von Renin und β -Galaktosidase-exprimierenden Zellen entlang der afferenten Arteriole der hRenMutLacZ $AT_{1a}^{-/-}$ Mäuse mehrere β -Gal positive Glomeruli auf einem Nierenschnitt unter dem Lichtmikroskop erkennbar sind, als in unbehandelten hRenMutLacZ Mäusen (Abbildung 3.29).

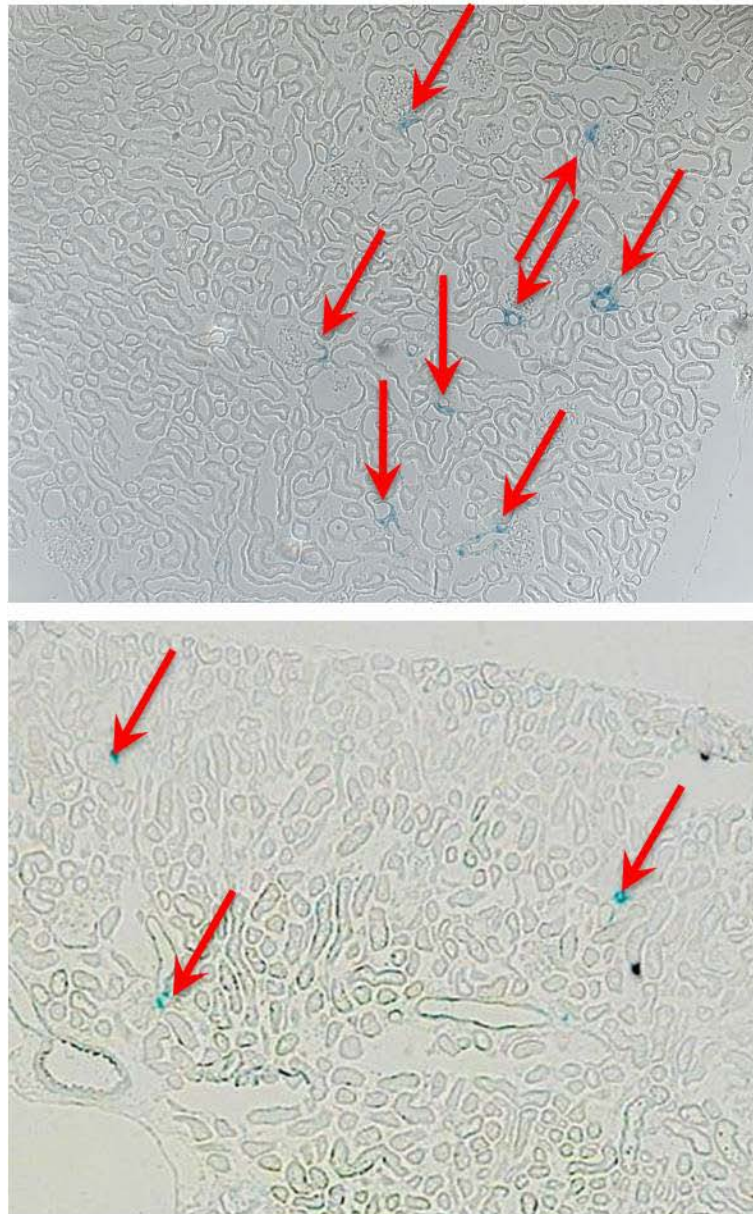


Abbildung 3.29: X-Gal Färbung zweier Nierenschnitte. A: Nierenschnitt einer mit hRenMutLacZ AT_{1a}^{-/-} Maus, B: Nierenschnitt einer hRenMutLacZ Maus. Der 5 μ M Kryoschnitt wurde für 10 min mit X-Gal-Färbelösung inkubiert. A und B bei 100 x Vergrößerung. Gefärbte Glomeruli mit rotem Pfeil gekennzeichnet.

Die 3D-Rekonstruktion in Abbildung 3.30 zeigt eindeutig das Kapillargeflecht des Glomerulums und die afferente Arteriole (rot). Weiterhin erkennt man den JG-Bereich am vaskulären Pol des Glomerulums, da in diesem Bereich Renin-Färbung positiv ist (grün). Ebenso tritt in diesem Bereich eine X-Gal-Färbung auf, was eine Expression von β -Galaktosidase widerspiegelt (blau). Beide mRNA-Transkripte werden auch in Zellen exprimiert, die entweder rekrutiert oder angelagert werden. Zwar sind keine Zellgrenzen vorhanden, trotzdem ist ersichtlich, dass je eine Zelle sowohl Renin als auch β -Galaktosidase exprimiert. Diese beiden Färbungen überlagern sich aber nicht, da die β -Galaktosidase im Kern lokalisiert ist, wohingegen Renin in Vesikeln im Zytosol gespeichert ist.

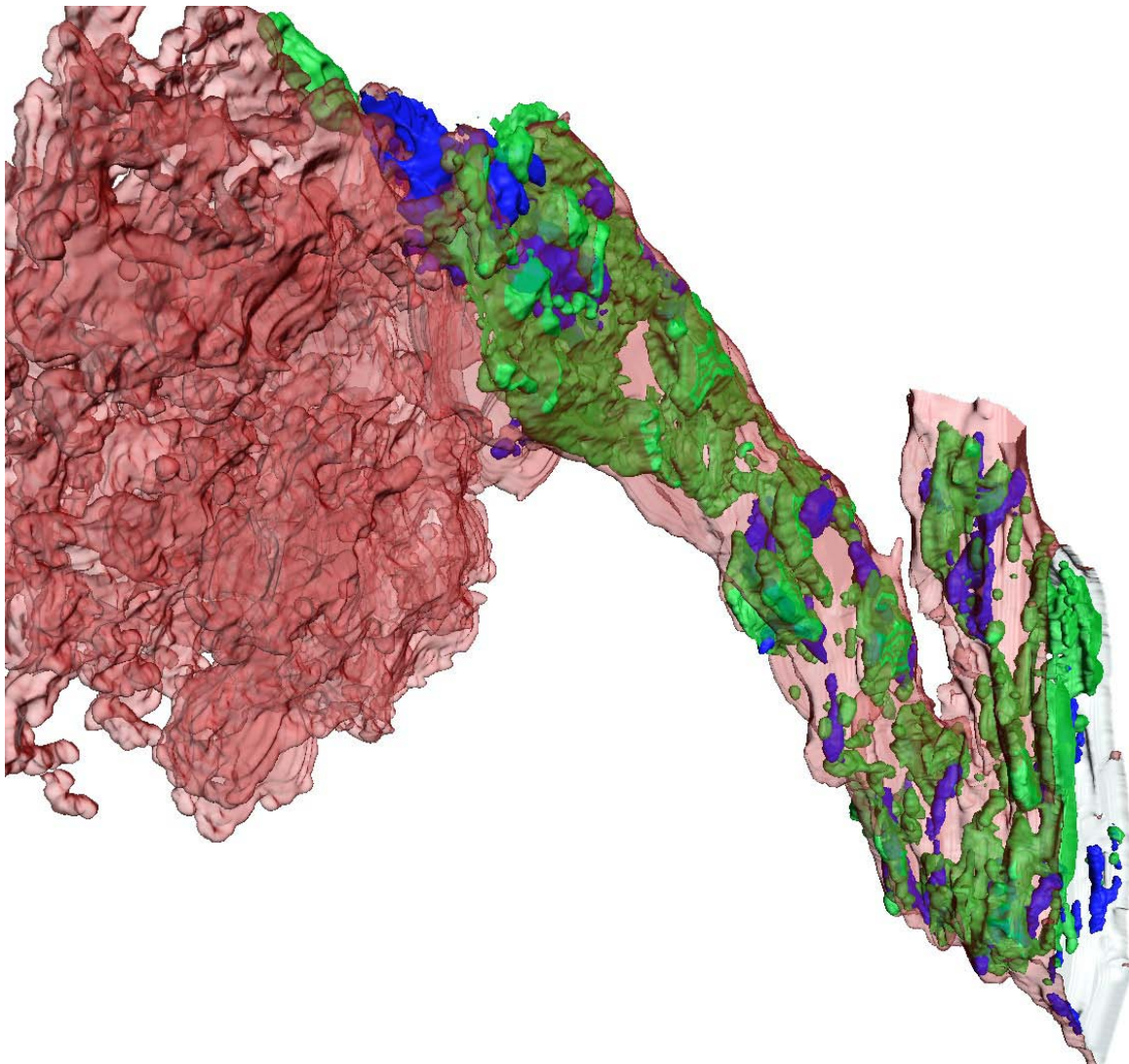


Abbildung 3.30: 3D-Rekonstruktion eines Teils einer hRenMutLacZ $AT_{1a}^{-/-}$ -Niere. In Rot sind die afferente Arteriole und das Kapillargeflecht des Glomerulums dargestellt. In grün ist Renin dargestellt. Blau stellt X-Gal-Färbung dar, repräsentativ für β -Galaktosidase-Expression. JG-Zellen und rekrutierte Zellen exprimieren sowohl LacZ als auch Renin.

Aus diesem Versuch und aus Abschnitt 3.2.3.2 lässt sich schließen, dass bei einer Rekrutierung bzw. Generierung neuer Renin bildender Zellen durch den Verlust des Effektes von Ang II, nicht nur der endogene Reninpromotor aktiviert wird, sondern auch der transgene humane Reninpromotor, was aber unabhängig von den cAMP-Zielsequenzen Enhancer CRE und proximales CNRE abläuft.

3.2.5.4 Regulation des Transgens durch Hochsalz- und Niedrigsalz-Diät

Eine weitere Änderung der Renin Gentranskription erhält man durch Änderung des Salzgehaltes im Futter der Tiere. So erniedrigt eine Hochsalz-Diät die Renin Gentranskription- und Sekretion. Umgekehrt führt niedrige Salzaufnahme zu einer Aktivierung der Renin Gentranskription- und Sekretion. Wie dieses Signal auf die JG-Zellen übertragen und in den JG-Zellen weitergeleitet wird und welche cis-regulatorischen Elemente im humanen Reninpromotor von Bedeutung sind, ist bis dato noch unbekannt.

Um das Reninsystem der hRenMutLacZ Mäuse zu stimulieren, wurden die Tiere für 10 Tage mit Niedrigsalz-Futter (0,02 % NaCl; Niedrigsalz) behandelt. Um es zu hemmen, wurden die Tiere für 10 Tage mit Hochsalz-Futter (4 % NaCl; Hochsalz) behandelt. Kontrolltiere erhielten normales Futter (0,6 % NaCl; Kontrolle) (Abbildung 3.31).

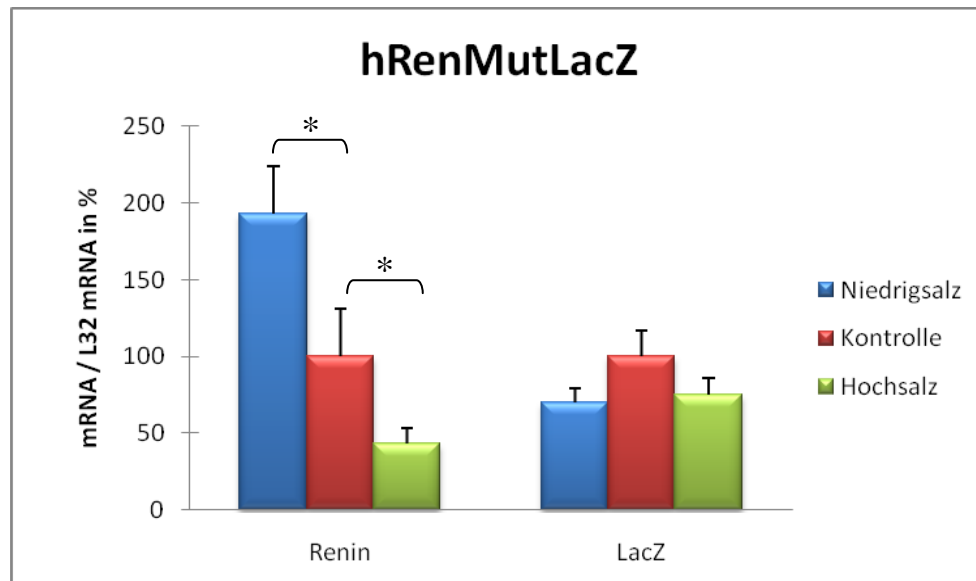


Abbildung 3.31: Die hRenMutLacZ Mäuse wurden für 10 Tage mit Niedersalz (0,02 % NaCl; blau), mit Normalsalz (0,6 % NaCl; rot) oder Hochsalz (4 % NaCl; grün) behandelt. Anschließend wurde eine Real-Time-PCR der Nieren Gesamt-RNA auf Renin, L32 und LacZ durchgeführt. Renin mRNA und LacZ mRNA wurden auf das Haushaltsgen L32 normalisiert. Die Kontrollen für Renin mRNA und LacZ mRNA wurden unabhängig voneinander auf 100% gesetzt. Als signifikant gekennzeichnet (*) wurden Werte mit $p < 0,05$.

Abbildung 3.31 zeigt, dass eine Erhöhung des Salzgehaltes im Futter der hRenMutLacZ Tiere eine Erniedrigung der Renin mRNA Abundanz auf 40 % der Kontrolle herbeiführt. Ausserdem ist gezeigt, dass eine Erniedrigung des Salzgehaltes im Futter der hRenMutLacZ Tiere eine Erhöhung der Renin mRNA Abundanz auf das doppelte der Kontrolle herbeiführt.

Betrachtet man jedoch den Effekt der beiden Salz-Diäten auf die LacZ Genexpression, so zeigt sich ein eindeutiger Unterschied zum endogenen Renin. Die LacZ Genexpression ist bei Niedersalz-Diät nicht wie erwartet erhöht, sondern eher tendenziell erniedrigt. Auch bleibt der Effekt der Hochsalz-Diät aus. Hier ist keine signifikante Abnahme der LacZ mRNA Abundanz zu erkennen, nur noch eine Tendenz. Somit zeigt sich, dass die salzabhängige Regulation der Renin Genexpression über die beiden cAMP Zielsequenzen proximales CNRE-Element und Enhancer CRE-Element gesteuert wird.

Um auszuschließen, dass der Effekt der Salz-Diät auf das Transgen aufgrund einer möglichen schwierigeren Spezies-abhängigen Regulierung des Transgens, bei geringen Änderungen im System, ausbleibt, wurde eine Wasser-Deprivation durchgeführt. Von diesem Manöver ist bekannt, dass es eine geringe Stimulation der Renin Genexpression hervorruft (Abbildung 3.32).

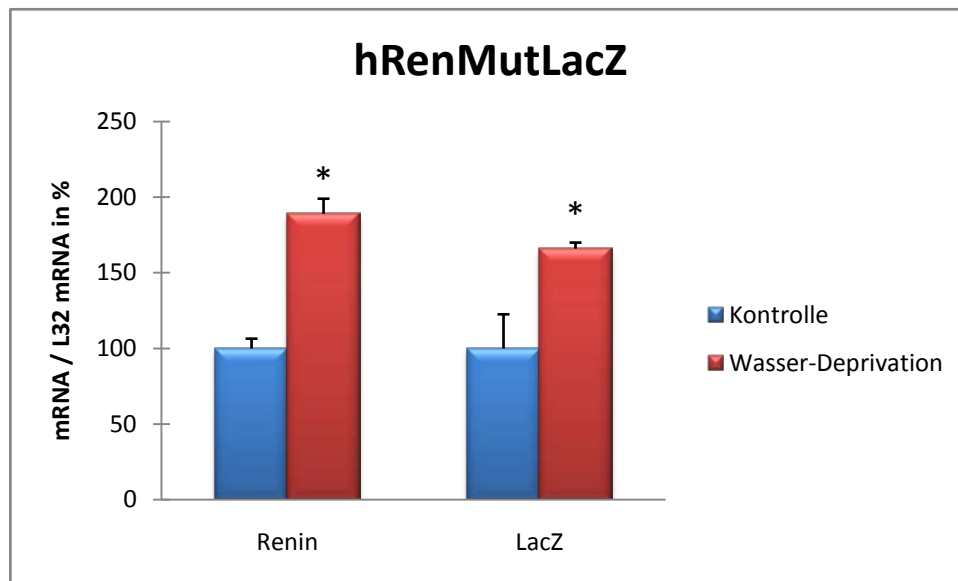


Abbildung 3.32: Den hRenMutLacZ Mäusen wurde für 1 Tag das Wasser entzogen (Wasser-Deprivation, rot) oder normales Wasser zugefügt (Kontrolle, blau). Anschließend wurde eine Real-Time-PCR der Nieren Gesamt-RNA auf Renin, L32 und LacZ mRNA durchgeführt. Renin mRNA und LacZ mRNA wurden auf das Haushaltsgen L32 normalisiert. Die Kontrollen für Renin mRNA und LacZ mRNA wurden unabhängig voneinander auf 100% gesetzt. Als signifikant gekennzeichnet (*) wurden Werte mit $p < 0,05$.

Abbildung 3.32 zeigt die erwartete Reaktion der Renin Gentranskription auf den Wasserentzug für 1 Tag. Es wird in etwa doppelt so viel Reninen in den JG-Zellen der Wasser-deprivierten Tiere transkribiert, als in den Kontroll Tieren. Eine Steigerung der LacZ mRNA Expression auf den Faktor 1,7 ist ebenso erkennbar. Dieser Versuch zeigt, dass der Effekt der Wasser-Deprivation unabhängig der cAMP-Zielsequenzen CRE und CNRE des humanen Reninpromotors abläuft. Hier ist der Faktor der LacZ mRNA kleiner als der Faktor der Renin mRNA, da es sich um speziesspezifische Promotoren und um unterschiedliche Primer handelt. Somit kann auch gesagt werden, dass systemische Änderungen, die eine geringe Änderung der Renin Gentranskription bewirken, auch durch das Transgen hRenMutLacZ angezeigt werden. Dies unterstreicht die Aussage, dass die cAMP-Zielsequenzen essentiell bei der Regulation der Renin Gentranskription sind, da trotz einer Regulation der endogene Renin Gentranskription bei den Salz-Diäten kein Effekt auf das Transgen hRenMutLacZ zu sehen ist.

4. Diskussion

An der Regulation des Blutdruckes und des Salz- und Wasserhaushaltes des Körpers ist das Renin-Angiotensin-System (RAS) essentiell beteiligt. Die Aktivität des RAS wird dabei hauptsächlich durch den Gehalt an Renin im Blutplasma bestimmt (Kurtz, 1989). Die Freisetzung des Renins und die Synthese des Renins aus bzw. in den juxtaglomerulären Zellen erfolgt dabei durch eine Vielzahl an Faktoren, wie z.B. renaler Perfusionsdruck (Finke et al., 1983), Salzhaushalt des Körpers (Hackenthal, 1990), sympathische Aktivität (Hackenthal, 1990) und humorale Faktoren, wie Bradykinin, Calcitonin Gene Related Peptide, Adrenomedullin, Stickstoffmonoxid und Prostaglandin (Keeton und Campell, 1981; Kurtz et al., 1988; Kurtz, 1989; Jensen et al., 1997). Die intrazelluläre Weitergabe dieser vielfältigen Stimuli ist bereits *in vitro* gut verstanden und erfolgt vor allem durch Kalzium und das zyklische AMP (Kurtz und Wagner, 1998). Ein Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration führt zu einer Hemmung der Renin-Sekretion und Synthese. Eine Erhöhung des zyklischen AMP führt zu einer gesteigerten Freisetzung und Synthese des Renins (Kurtz et al., 1984; Hackenthal et al., 1990).

Die Regulation der Freisetzung einer Vielzahl an sekretorischen Proteinen wird nicht nur über die Regulation der Sekretion gesteuert, sondern ebenfalls über die Regulation der Synthese und der Stabilität des Proteins. Auf der anderen Seite werden aber auch eine Vielzahl von Proteinen direkt durch die Erhöhung bzw. Verminderung der Transkription des Gens reguliert (Bjorklund et al., 1999).

Auch für Renin ist bekannt, dass es durch transkriptionelle Mechanismen gesteuert wird (Pan und Gross, 2005).

Wie schon erwähnt ist die Regulation der Renin Gentranskription mit den dabei wichtigen cis-Elementen im Reningen und den Transkriptionsfaktoren der Renin produzierenden Zelle *in vitro* bereits gut erforscht. Auch kennt man viele physiologische und pathophysiologische Mechanismen, die *in vivo* eine Änderung in der Renin Gentranskription herbeiführen. Ungeklärt blieb bislang jedoch, welche systemischen Regulationsfaktoren welche molekularen Regulationsfaktoren nutzen, um *in vivo* den Effekt der Stimulation oder Hemmung auf die Renin Gentranskription zu übertragen (Abbildung 4.1).

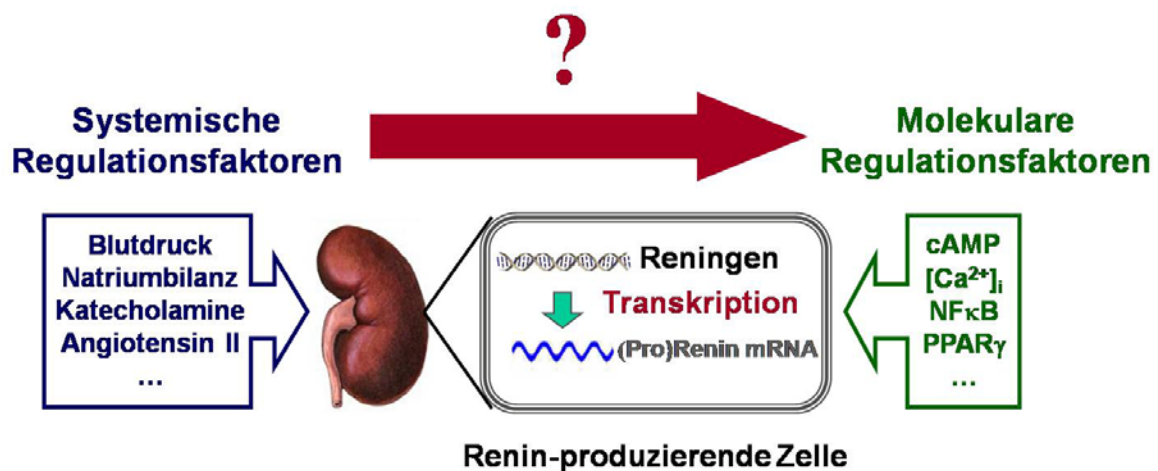


Abbildung 4.1: Regulation der Renin Gentranskription.

In dieser Arbeit wurden die cis-wirkenden Elemente des cAMP-Signalweges des humanen Reninens *in vitro* bestimmt und diese dann *in vivo* auf die physiologische Relevanz hin bei Änderungen in der Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems getestet.

Es gibt reichlich Anzeichen dafür, dass Änderungen in der Aktivität der Adenylatzyklasen und folglich in der Konzentration von cAMP, eine entscheidende Rolle in der Expression und Sekretion des Renins spielen (Hackenthal und Taugner, 1986). Viele Rezeptoren, die Signale auf die Renin Gentranskription vermitteln, gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die ihre Aktivierung über die Adenylatzyklasen und somit über cAMP weitergeben (Chen et al., 2006; Kim et al., 2007). Der cAMP Signalweg ist grundsätzlich von allen Signalwegen, die auf die Renin Genexpression wirken, am besten charakterisiert, weswegen ich die Zielsequenzen dieses Signalwegs im humanen Renin im Detail analysiert habe. Die Entschlüsselung der Regulation des humanen Reninpromotors ist von großer Bedeutung, da eine erhöhte Reninexpression und Sekretion mit kardiovaskulären Krankheiten (wie Bluthochdruck oder Herzinsuffizienz) und Nierenkrankheiten verbunden ist.

Diese Arbeit zeigt somit zum ersten Mal einen direkten Zusammenhang zwischen den *in vitro* nachgewiesenen aktiven cAMP-Zielsequenzen und deren Wichtigkeit in der Regulation der Renin Gentranskription *in vivo*.

Aus der Literatur bekannte und studierte cAMP-Zielsequenzen im humanen proximalen Reninpromotor sind einerseits das cAMP response element (CRE) bei -226 bp bis -219 bp (Ying et al., 1997) und andererseits das cAMP and overlapping negative regulatory element (CNRE) bei -130 bp (Tamura et al., 2004) relativ zum Transkriptionsstart (+1 bp). Im distalen humanen Enhancer befindet sich eine cAMP-Zielsequenz, das Enhancer CRE-Element, (Pan et al., 2001, Klar et al., 2002).

Über diese drei cAMP-Zielsequenzen wurden, bezüglich ihrer Funktionalität in der Renin Gentranskription, *in vitro* kontroverse Ergebnisse veröffentlicht. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit zunächst *in vitro* Experimente durchgeführt, um die Wichtigkeit der drei cAMP-Zielsequenzen bei der Renin Gentranskription unter den gegebenen Versuchsbedingungen aufzuklären. Hierzu wurde die humane Zelllinie Calu-6 verwendet (Lang et al., 1995). Diese Zelllinie weist endogene Renin Genexpression auf und teilt mit den eigentlichen Renin produzierenden Zellen, den juxtaglomerulären Zellen nicht nur die Renin Genexpression, sondern auch die hohe Induzierbarkeit durch cAMP (Germain et al., 1997). Eine weitere Gemeinsamkeit mit den JG-Zellen stellt die geringe basale Renintranskriptionsrate dar (Lang et al., 1996). Diese Zelllinie wurde auch schon in vielen anderen Experimenten zur Aufklärung der Regulation der Renin Gentranskription verwendet (Lang et al., 1996; Ying et al., 1997; Tamura et al., 2004, Todorov et al., 2007, Todorov et al., 2008).

Das erste cAMP-Zielelement, das ich *in vitro* untersucht habe, war das proximale CNRE-Element. Nakamura et al. (1989) konnten dieses CNRE-Element im Maus Reninpromotor lokalisieren. Die CNRE-Stelle ist im humanen Reningen konserviert (bei Position – 130 bp relativ zum Transkriptionsstart +1 bp). Die ersten Studien zeigten, dass dieses Element basal in den murinen pituitary tumor AtT-20- Zellen und in den choriocarcinoma JEG-Zellen die Expression des Reportergens hemmt. Bei Stimulation der Zellen mit 8-Bromo-cAMP, einem cAMP-Analog, wurde dieses Promotorfragment aktiviert. Auch andere Gruppen konnten zeigen, dass das CNRE-Element des murinen Reningen in einer cAMP-abhängigen Regulation der Renin Gentranskription involviert ist (Horiuchi et al., 1991; Horiuchi et al., 1993).

In weiteren Studien der Arbeitsgruppe Dzau an diesem Element konnte der Transkriptionsfaktor, welcher das cAMP-Signal auf den Promotor weitergibt, identifiziert werden. So wurde durch ein Yeast one-hybrid System der Transkriptionsfaktor LXR α als

CNRE-Bindeelement gefunden (Tamura et al., 2000). In dieser Studie wurde die murine immortalisierte Renin produzierende JG-Zelllinie As4.1 verwendet. In diesen Zellen wird aber LXR α nicht exprimiert. Es wurde angenommen, dass dies der Grund für die abwesende Aktivierung der Renin Gentranskription durch cAMP-Agonisten sei. Diese These konnte allerdings von Klar et al. (2002) in einer späteren Arbeit widerlegt werden. Für die Bindestudien von Tamura et al. (2000) wurde LXR α überexprimiert und mit den Kernextrakten der transfizierten As4.1-Zellen electromobility shift assays (EMSA) durchgeführt. Als Sonde diente ein markiertes CNRE-Element.

Mit Hilfe eines Konstrukts von -365 bp bis +16 bp relativ zum Transkriptionsstart +1 bp des murinen Reninpromotors, welches davor noch drei Kopien eines CNRE-Elements trägt, die mit dem Promotor zusammen ein Luziferasegen steuern, konnte Tamura et al. (2000) einen funktionellen Zusammenhang zwischen cAMP, LXR α und dem CNRE-Element nachweisen. Sie zeigten, dass nach stabiler Transfektion von LXR α eine cAMP induzierte Aktivierung der Renin Gentranskription möglich ist. Durch Immunpräzipitation von LXR α überexprimierenden Zellen zeigten Morello et al. (2005) eine vermehrte LXR α Bindung an den murinen Promotor bei Gabe von 8-Bromo-cAMP.

In einer Arbeit von Tamura et al. (2004) wurde gezeigt, dass auch das humane Renin über einen direkten Effekt von cAMP über LXR α auf das CNRE-Element reguliert wird. Die Versuche wurden mit den Calu-6-Zellen durchgeführt. LXR α wurde auch hier überexprimiert. Mit Kernextrakten dieser Zellen wurden Bindestudien mit einer Sonde, die das CNRE-Element trägt, durchgeführt. Es wird ausserdem die Existenz von LXR α in JG-Zellen von humanen Nieren angenommen. Dies führt zu der Theorie, dass die humane Renin Genexpression durch die LXR α -Bindung an das CNRE-Element reguliert wird.

Auch *in vivo* wurden bereits Versuche über die Relevanz des CNRE-Elements in der Regulation der Renin Gentranskription durchgeführt. In der Arbeit von Morello et al. (2005) wurde erstmals gezeigt, dass LXR α in den Renin produzierenden JG-Zellen *in vivo* mit Renin ko-exprimiert wird. Die endogene Renin mRNA Abundanz nimmt bei LXR α -Agonisten-Applikation zu. Desweiteren zeigten sie eine vermehrte Bindung von LXR α aus Kernextrakten von Isoproterenol (cAMP-Agonist) behandelten Mäusen an eine markierte CNRE-Sonde.

Ausserdem konnten Versuche an LXR α -Knockout Mäusen zeigen, dass nach Isoproterenol-Applikation der Effekt der Erhöhung der Renin mRNA Menge und auch der Plasma-Reninaktivität ausbleibt, was in der Wildtyp Maus schon der Fall ist. Hingegen

zeigten Befunde von Tanimoto et al. (2008), die eine transgene Maus mit einer Mutation im CNRE-Element generierten, dass diese Stelle sowohl für die basale Expression als auch für die Regulation durch Blutdruck, durch Ang II, durch Hochsalz und durch Wasser-Deprivation unwichtig ist.

Aus diesem Grund untersuchte ich in dieser Arbeit als erstes das CNRE-Element des humanen Reninpromotors bezüglich seiner Regulierbarkeit nach Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Als cAMP-Agonisten wurden die Substanzen Forskolin und PACAP (pituitary adenylatecyclase activating polypeptide) verwendet. Forskolin ist membrangängig und aktiviert alle exprimierten Adenylatzyklen einer Zelle. PACAP hingegen bindet an den PACAP (PAC-1)-Rezeptor, welcher nach Bindung alle Adenylatzyklen aktiviert, mit denen er in funktioneller Verbindung steht.

In meinem Versuch konnte keine Änderung in der Luziferase-Aktivität festgestellt werden (Abbildung 3.2). Da aber bei früheren Versuchen von Tamura (2004) und Morello (2005) LXR α überexprimiert wurde, konnte nicht definitiv ausgeschlossen werden, dass die CNRE Stelle eine Zielsequenz für den cAMP-Weg ist.

Als nächstes wurde das humane proximale Promotor CRE-Element untersucht. Smith et al. (1994) identifizierten an der Stelle -222 bp bis -218 bp relativ zum Transkriptionsstart (+1 bp) ein Element, das starke Homologie mit einem kanonischen CRE-Element aufweist. Durch Bindestudien mit Kernextrakten aus Chorio-decidual-, JEG-3- und HeLa-Zellen konnten sie gleiche Proteinkomplexe nachweisen, die an das kanonische bzw. an das humane Renin CRE-Element binden. Ausserdem postulierten sie anhand humaner Reninpromotor-Studien, dass dieses Element für die Stimulierbarkeit des Konstrukts durch Forskolin in stabil-transfizierten Chorio-decidual-Zellen verantwortlich ist.

Basierend auf den Ergebnissen von Smith et al. zeigten andere Studien, dass das proximale Promotor-Element in Chorio-decidual-Zellen funktionell aktiv ist, wenn das CRE bindende Protein (CREB) mit dieser Stelle interagiert (Germain et al., 1996; Germain et al., 1997). Die optimale CRE-Aktivität wird dabei aber nur erreicht, wenn zusätzlich ein pituitary-specific trans-acting factor (Pit-1) Element an der Position -77 bp bis -67 bp stromaufwärts des humanen Reninpromotors +1 bp vorhanden ist. Sind beide Elemente funktionslos mutiert, sinkt die basale Aktivität der Luziferase und eine Stimulation des 582 bp großen Konstruktes durch intrazelluläre cAMP-Erhöhung ist unmöglich. Ist nur die CRE-Stelle mutiert, so ist eine Induzierbarkeit des Konstrukts nur noch um den Faktor 1,7, allerdings mit einer reduzierten basalen Aktivität, beschrieben. Der gleiche Stimulations-Faktor

konnte mit einem 145 bp großem Konstrukt, das nur das Pit-1 Element trägt, erreicht werden. Ist nur die CRE-Stelle aktiv, so ist lediglich eine Erhöhung der Promotoraktivität um den Faktor 1,4 möglich. Sind beide Elemente aktiv, so erhöht sich die Stimulation um den Faktor 2,4. In allen Konstrukten war jedoch auch das CNRE-Element vorhanden, weswegen die Aktivitätssteigerung des Promotors auch durch das CNRE-Element ausgelöst worden sein könnte. Demnach kann dem proximalen CRE-Element allein keine vollständige Induzierbarkeit durch cAMP zugeschrieben werden. Vielmehr wird angenommen, dass es für die basale Aktivität von Bedeutung ist. Passend dazu konnte auch im Zuge meiner Arbeit keine Induktion der Aktivität von proxCREhRenMin durch cAMP-Agonisten festgestellt werden. Da nicht bekannt ist, ob die Calu-6-Zellen LXR α exprimieren, scheidet wahrscheinlich auch das CNRE-Element als Aktivator aus.

Ying et al. (1997) zeigten in ihren Versuchen bezüglich der humanen proximalen CRE-Stelle, dass trotz einer Mutation dieser, eine Simulation des Promotors durch cAMP noch möglich ist. Diese Stimulation erscheint aber geringer als bei unmutierter proximaler CRE oder consensus CRE, wobei letztere am stärksten durch cAMP induziert wird. Ferner ist die basale Aktivität abgeschwächt. Dies unterstreicht meine Ergebnisse, da eine cAMP-abhängige Aktivierung des Konstrukts consCREhRenMin (Abbildung 3.8), welches die consensus CRE an Stelle des proximalen CRE trägt, auf das Doppelte erzielt wurde (Abbildung 3.9). Die Arbeitsgruppe Ying nimmt an, dass in diesem 900 bp großen humanen Reninpromotor-Fragment die cAMP-abhängige Stimulation auch über einen CRE-unabhängigen Mechanismus ablaufen könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Konstrukt proxCREhRenMin, obwohl es die komplette endogene humane Reninpromotorsequenz von +1 bis zum proximalen CRE-Element relativ zum Transkriptionsstart trägt, nicht durch cAMP-Agonisten induzierbar ist. Erst eine Mutation der proximalen Sequenz in die consensus Sequenz führt zu einer Induzierbarkeit des Promotors. Daraus lässt sich schließen, dass das humane proximale CRE-Element zwar für die basale Renin Genexpression von Bedeutung ist, jedoch für die cAMP-abhängige Regulation des humanen Reninpromotors keine Rolle spielt. Für alle folgenden Versuche wurde daher dieses Element außer Acht gelassen.

Die letzte zu untersuchende cAMP-Zielsequenz ist das humane distale Enhancer CRE-Element. Die von mir durchgeführten Versuche zeigen, dass dieses CRE-Element, kloniert an den minimalen humanen Reninpromotor (enhCREhRenMin, Abbildung 3.10) zu einer

Aktivitätssteigerung des Promotors um den Faktor 2 nach cAMP-Agonisten-Applikation führt (Abbildung 3.11). Diese Stelle scheint folglich von funktioneller Bedeutung bei der cAMP-abhängigen Regulation des humanen Reningens zu sein. Dieses Ergebnis ist stimmig mit den Ergebnissen von Pan et al. (2001) und Klar et al. (2002). Beide zeigten unabhängig voneinander, dass eine Mutation dieses Elementes in einem murinen Reninpromotor-Stück der Maus zu einem Verlust der basalen Aktivität führt und auch eine Induktion durch intrazelluläre cAMP-Erhöhung unmöglich macht.

In meiner Arbeit wurde *in vitro* das humane Enhancer CRE-Element isoliert betrachtet zum ersten Mal untersucht. Eine Studie Zhou et al. (2006) befasst sich mit der Funktionalität des kompletten humanen Reninenhancers. Im Enhancer sind neben dem CRE-Element noch andere Elemente enthalten, die für eine maximale Stimulation der Transkription essentiell sind. Zhou et al. untersuchten eine transgene Maus, die das humane Reningen und zusätzlich noch weitere Gene auf einem Pacmid trägt, wobei der Enhancer des Reningens deletiert war. Sie zeigten, dass das humane Reningen trotz der Deletion des Enhancers in den JG-Zellen mit endogenem Renin ko-exprimiert wurde. Ausserdem konnten sie mit Hilfe der zusätzlichen Gene des Pacmids, als interne Kontrolle, eine basal geringere Expression des Reningens als der Kontrollgene in der Niere nachweisen. Eine Behandlung der transgenen Mäuse mit Captopril, einem angiotensin converting enzyme (ACE)-Inhibitor, zeigte aber keinen Unterschied in der Regulation der Expression von endogenem und exogenem Renin. Ob die basale Expression aufgrund des Verlusts des CRE-Elements oder eines der anderen Elemente des Enhancers auftrat, ist nicht bekannt.

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass eine Deletion des endogenen Reninenhancers, inklusive des CRE-Elements der Maus, zu einem Verlust der vollständigen Aktivierung der Renin Gentranskription bei Nidrigsalz-Diät in Kombination mit ACE-Inhibitor führt (Markus et al., 2007). Ob dies am Verlust des Effekts der Nidrigsalz-Diät oder des ACE-Inhibitors liegt, ist nicht geklärt. Ausserdem sind in dieser Maus, zusätzlich zum murinen Reninenhancer noch weitere Enhancer-flankierende 486 bp deletiert, was die Unstimmigkeiten mit den Ergebnissen von Zhou et al. erklären könnte. Übereinstimmend in beiden Arbeiten ist jedoch die erniedrigte basale Renin Gentranskription, welche auch die Arbeitsgruppe Chen et al. (2006) in ihrer JG-spezifischen G_salpha KO-Mauslinie zeigen konnte. Hier ist die basale Expression der Renin mRNA der Niere stark erniedrigt, was für die wichtige Funktion des cAMP-

Signalweges und somit der Enhancer cAMP-Zielsequenz in der basalen Renin Genexpression spricht.

Aufgrund der *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse bezüglich der cAMP-Zielsequenzen im Reninpromotor ergibt sich die Möglichkeit, dass mehrere regulatorische Elemente an der Renin Gentranskription beteiligt sind, die möglicherweise redundant sind. Eine solche Annahme entspricht der weit angenommenen zentralen Rolle des cAMP-Signalweges in der Kontrolle des Reningens. Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass die Mutation des distalen Enhancer CRE-Elements und des proximale CNRE-Element in einem Reninpromotor-Fragment, das ausreichend für die Zell-spezifische Expression und Regulation ist, zum Verlust der cAMP Transaktivierung *in vitro* führt, wurde ihre Bedeutung *in vivo* weiter untersucht.

Es wurden zwei Mausstämme generiert, die beide das identische Expressionsmuster des Reportergens LacZ zeigten. Deswegen wurde im Folgenden nur ein Mausstamm weiter untersucht. Die Expression des LacZ-Gens wurde mit Hilfe einer X-Gal-Färbung nachgewiesen. Hierbei handelt es sich bei dem Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität ausschließlich um die transgene bakterielle β -Galaktosidase, da in dem pH-Bereich gearbeitet wurde (pH 6-8), in dem nur die bakterielle aktiv ist. Die endogene murine β -Galaktosidase ist ausschließlich bei pH 3-5 aktiv (Inada et al., 2006). Anhand eines WT-Nierenschnittes konnte eine endogene LacZ-Aktivität definitiv ausgeschlossen werden.

Fuchs et al. (2002) generierten eine transgene Maus, die das „Wildtyp“-12,2 kb Reninpromotor-Fragment trägt, welches das LacZ-Gen steuert, vergleichbar mit der von mir generierten transgenen Maus. Castrop et al. (2006) generierten eine transgene Maus, die gleichermaßen das „Wildtyp“ Reninpromotor-Fragment trägt, aber die Cre-Rekombinase steuert. Beide Arbeitsgruppen konnten übereinstimmend mit den hier gezeigten X-Gal Färbungen eine Aktivität des Transgens in der afferenten Arteriole am vaskulären Pol des Glomerulums (Abbildung 3.16) zeigen, wobei die Gruppe Fuchs zeigt, dass die β -Galaktosidase parallel zum endogenen Renin in den JG-Zellen exprimiert wird. Dies wies die Arbeitsgruppe immunhistochemisch mit spezifischen Antikörpern nach. Ähnliche Befunde berichten auch Sinn et al. (1999). Sinn generierte eine Maus, die als Transgen den humanen Reninpromotor auf einem Pacmid trägt und zeigte immunhistochemisch, dass humanes Renin und endogenes murines Renin in den JG-Zellen ko-exprimiert werden. In meiner Arbeit wurde die Expression des Transgens wie schon

erwähnt durch X-Gal-Färbung nachgewiesen. Der Vorteil des Aktivitätsnachweises des mutierten humanen Reninpromotors über dieses Reportersystem liegt in der höheren Sensibilität von LacZ, verglichen mit einer immunhistochemischen Färbung.

Färbt man auf den hRenMutLacZ Nieren-Schnitten zusätzlich zu X-Gal endogenes Renin, so erhält man doppelt gefärbte Zellen. Renin und die β -Galaktosidase wird in den JG-Zellen ko-exprimiert (Abbildung 3.17, Abbildung 3.18).

Arbeitsgruppen, die den murinen Reninpromotor untersuchten, konnten zeigen, dass der Enhancer für die JG-Zell-spezifische Expression unbedeutend ist. Die Menge der transkribierten Renin mRNA in den JG-Zellen ist aber drastisch reduziert (Adams et al., 2006; Markus et al., 2007). Dieses Ergebnis erzielte auch die Gruppe um Glenn et al. (2008) mit einer Enhancer-deletierten RenGFP-transgenen Maus und die Arbeitsgruppe Zhou et al. (2006) mit dem schon erwähnten humanen Enhancer-deletierten Reninpromotor-Pacmid. Ob dieser basale Effekt aufgrund der Deletion des CRE-Elements oder aufgrund der Deletion des gesamten Enhancers auftritt bleibt unklar. Für eine potentiell wichtige Rolle des Enhancer CRE-Elements in der basalen Expression des Reningens sprechen die Ergebnisse von Chen et al (2006). Diese zeigen, dass bei einer JG-spezifischen Deletion der G-Protein Untereinheit G_{α} die Renin Gentranskription drastisch reduziert ist. Nach Stimulation eines mit dem G-Protein gekoppelten Rezeptors aktiviert die G_{α} -Untereinheit die Membran-assoziierten Adenylatzyklen, welche cAMP aus ATP generieren.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die beiden cAMP-Zielsequenzen für die JG-Zell-spezifische Expression unwichtig sind. Aufgrund dieser Tatsache konnten mit dieser Maus Studien über die Regulation des Konstruktes durchgeführt werden, wobei die endogene Renin Genexpression als Positivkontrolle diene.

Auf Schnitten mit 10 minütiger Färbung war β -Gal-Expression nur am vaskulären Pol der afferenten Arteriole erkennbar, was auf eine allenfalls geringe Transgenexpression in der Niere außerhalb der Renin-produzierenden JG-Zellen hindeutet. Fuchs et al. (2002) und auch Castrop et al. (2006) hingegen fanden eine Transgenexpression in interlobularen Arterien. Castrop wies die Cre-Rekombinase mit Cre-Antikörpern und Fuchs die β -Galaktosidase über X-Gal-Färbung nach. Die X-Gal-Färbungen wurden daher für die weiteren Versuche über 20 h durchgeführt, um auch noch sehr geringe Transgen-Expression in der Niere nachweisen zu können.

Die Inkubation der Nieren-Kryo-Schnitte über 20 h mit X-Gal zeigte Kernfärbungen in interstitiellen Zellen von Medulla und Kortex, welche keiner bestimmten Zellpopulation zugewiesen werden konnten. Ausserdem konnte eine X-Gal-Färbung in interlobularen Arterien, im Glomerulum, am vaskulären Pol des Glomerulums und entlang der afferenten Arteriole nachgewiesen werden (Abbildung 3.19). Weder die Arbeitsgruppen Fuchs et al. (2002) noch Castrop et al. (2006) konnten eine Promotoraktivität ihrer Konstrukte in den interstitiellen Zellen von Medulla und Kortex sowie in Zellen des Glomerulums aufzeigen. Hier ist aber unklar, ob die divergierenden Ergebnisse aufgrund der Mutationen in CRE und CNRE, der unterschiedlichen Nachweismethoden und ihrer Sensibilität und Spezifität oder der ungleichen Integrationsorte der Konstrukte im Genom auftreten. Übereinstimmend mit beiden Arbeitsgruppen ist aber die Expression in den interlobularen Arterien.

Da bekannt ist, dass auch extrarenale Organe lokale RAS besitzen (Bader und Ganten, 2008), in welchen aber Renin immunhistochemisch nicht nachweisbar ist, wurden verschiedene Organe der hRenMutLacZ Maus auf β -Galaktosidase-Aktivität untersucht. Diese konnte in Gefäßen und in einzelnen, nahe der Basalmembran gelegenen Zellen des Hodens, in größeren Gefäßen der Leber, in geringen Mengen im Herzen, in Gefäßen und in einzelnen Zellen des Fettgewebes, in größerem Ausmaß in Zellen der Lunge und des Ovars und in vereinzelter Zellen des Kortex und der Kapsel der Nebenniere nachgewiesen werden (Abbildung 3.21).

Fuchs et al. (2002) stellten extrarenale Aktivität in geringerem Ausmaß in der adulten Nebenniere, sowie in sehr geringer Menge in Gehirn und Herz fest. In der hRenMutLacZ Maus wurde hingegen im Hirn keine LacZ-Expression festgestellt. Fuchs et al. fanden keine Expression der β -Galaktosidase in den untersuchten Geweben Lunge, Leber und Milz. Ob die Unterschiede in der Expression der β -Galaktosidase zwischen der hRenMutLacZ Maus und der von Fuchs et al. (2002) generierten Maus auf die mutierten CRE- und CNRE-Elemente im Konstrukt hRenMutLacZ zurückzuführen sind, kann nur spekuliert werden. Es könnte auch der Fall sein, dass aufgrund eines anderen Integrationsortes des hRenMutLacZ-Fragments im Genom, im Vergleich zum Konstrukt von Fuchs et al., die Expression der β -Galaktosidase nachgewiesen werden konnte.

Übereinstimmend mit meinem Ergebnis ist der Nachweis der Cre mRNA-Expression in sehr geringen Mengen im Hoden, in der Leber und in der Nebenniere der transgenen Mäuse von Castrop et al. (2006).

Wie aus den Abbildungen 3.17 und 3.18 klar ersichtlich ist, beeinflussen die Mutationen im humanen Reninpromotor die JG-Zell-spezifische Expression nicht. Daher wurde als nächstes untersucht, ob der Promotor hRenMut nach Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch den β -Adrenorezeptor-Agonist Isoproterenol im Nieren-Kortex aktivierbar ist. Dass der humane Reninpromotor generell in den JG-Zellen der Maus durch Isoproterenol regulierbar ist, zeigten Castrop et al. (2006) mit einer Aktivitätssteigerung des humanen Reninpromotors um 180 %. Abbildung 3.22 verdeutlicht den Verlust der Aktivierbarkeit des mutierten Konstrukts durch cAMP, was sehr gut zu den *in vitro* Ergebnissen dieser Arbeit passt. Die endogene Renin mRNA-Abundanz steigt hingegen um den Faktor 2 an.

Auch Chen et al. (2006) sahen keine Isoproterenol-induzierte Stimulation der Renin Synthese in ihren JG-spezifischen $G\alpha$ KO-Mäusen, was für die Kaskade cAMP/PKA zur Stimulation der Renin Gentranskription in den JG-Zellen spricht. Dies zeigte auch die Arbeitsgruppe um Kim (2007), welche keine Stimulation der Renin Gentranskription in der Niere und in angereicherten JG-Zellen von G-Protein gekoppelten $\beta 1/\beta 2$ -Adrenorezeptor KO-Mäusen nachweisen konnte.

Behandelt man Mäuse mit dem ACE-Inhibitor Enalapril, so bewirkt die Hemmung des ACEs, dass kein Angiotensin II aus Angiotensin I generiert wird. Somit fehlen der direkte und der über den Blutdruck ausgeübte indirekte negative Feedback auf die Renin Gentranskription, was zu einer Erhöhung der Renin mRNA Abundanz und auch zu einer Rekrutierung der Renin produzierenden Zellen entlang der afferenten Arteriole führt (Sequeira Lopez et al 2001).

Eine Behandlung der hRenMutLacZ Maus mit Enalapril erhöhte sowohl die endogene Renin mRNA Abundanz als auch die LacZ mRNA Abundanz (Abbildung 3.23). Diese systemische Regulation läuft demnach unabhängig der cAMP-Zielsequenzen CRE und CNRE ab. Eine Erhöhung der murinen Renin mRNA Abundanz nach ACE-Hemmung, trotz Mutation im CNRE-Element, zeigte auch die Studie von Tanimoto et al. (2008). In Abbildung 3.24 ist die erwartete Rekrutierung von Renin bildenden Zellen entlang der afferenten Arteriolen eindeutig zu erkennen. Diese Zellen ko-exprimieren auch die β -Galaktosidase. Die Auswirkungen des Verlustes der negativen Rückkopplung von Ang II bestätigt zusätzlich die transgene Maus hRenMutLacZ $AT_{1a}^{-/-}$. Diese Maus entstand durch Kreuzung der hRenMutLacZ Maus mit einer Ang II-Rezeptor Typ 1a KO Maus. In dieser Maus ist der Angiotensin II-Rezeptor Typ 1a global ausgeknockt, was einen ähnlichen

Effekt wie eine Applikation eines AT_{1a}-Blockers oder eines ACE-Inhibitors zufolge hat. In dieser Maus wurden ebenso Renin und LacZ produzierende Zellen entlang der afferenten Arteriole rekrutiert und zusätzlich Renin- und LacZ-positive Zellen an die afferente Arteriole bzw. an den vaskulären Pol des Glomerulums angelagert (Abbildung 3.27 und 3.28).

Passend zu meinem Ergebnis zeigten Zhou et al. (2006) anhand transgener Mäuse, die den humanen Enhancer-deletierten Reninpromotor tragen, dass nach Applikation eines ACE-Inhibitors die negative Rückkopplung auf die Renin Gentranskription noch intakt ist. Auch Markus et al. (2007) beobachteten bei ihren Mäusen, dass bei Abwesenheit des murinen Enhancers die Erhöhung der Renin Gentranskription durch die Kombination aus ACE-Hemmer und Niedrigsalz-Diät noch regulierbar ist, jedoch um 50 % geringer als in der Wildtyp-Kontrolle. Diese Befunde deuten darauf hin, dass vermutlich andere Sequenzen des humanen Reninpromotors bei der Regulation mittels Ang II von Bedeutung sind. Eine Kompensation der CNRE-Sequenz kann hier ausgeschlossen werden, da diese in unserem Versuchsansatz ebenso mutiert wurde und der Effekt des Angiotensin II trotzdem zu beobachten war.

Sinn et al. (1999), Fuchs et al. (2002) und Castrop et al. (2006) zeigten unabhängig voneinander, dass der humane Reninpromotor als Transgen in der Maus sowohl bei Hochsalz-Diät als auch bei Niedrigsalz-Diät gleich dem endogenen Renin reguliert wird, wobei die Arbeitsgruppe Castrop die Niedrigsalzdiät mit dem ACE-Inhibitor Enalapril kombinierte. Setzt man die Mäuse mit dem mutierten humanen Reninpromotor auf verschiedene Salzdiäten, so wird zwar die endogene Renin mRNA richtig reguliert, das heisst vermehrte Expression bei Niedrigsalz-Diät, verminderte Expression bei Hochsalz-Diät, die Regulierung des Konstrukts hRenMutLacZ bleibt aber wider erwartend aus (Abbildung 3.31). Die Regulation der Renin mRNA Synthese bei Änderungen in der Salz-Diät verläuft somit über die beiden cAMP-Zielsequenzen Enhancer CRE-Element und proximales CNRE-Element.

Wie bereits erwähnt, generierten Kim et al. (2007) β 1- und β 2-Adrenorezeptor KO-Mäuse. Werden diese auf Hoch- bzw. Niedrigsalz-Diät gesetzt, so zeigen sie zwar noch eine korrekte Regulation der Reninsekretion, die Unterschiede im Vergleich zu Normalsalz sind aber geringer als in den Wildtyp-Mäusen. Weiterhin zeigen sie, dass bei Hochsalz-Diät die Änderung in der Renin mRNA Abundanz im Vergleich zu Normalsalz-Diät in β 1/ β 2-Adrenorezeptor KO-Nieren geringer ist als bei den Wildtypen. Behandlung der Wildtyp-

und KO-Mäuse mit Niedrigsalz-Diät und zugleich Enalapril, zeigt in beiden Stämmen eine Erhöhung der PRC und der Renin mRNA Abundanz, wobei diese in den KO-Tieren geringer ist als in den Wildtypen. Man kann vermuten, dass die Salz-Diät partiell über die $\beta 1/\beta 2$ -Adrenorezeptoren, welche auf die cAMP-Zielelemente im Reningen zielen, die Renin Gentranskription reguliert.

Einen wichtigen Einblick könnte hier die Maus von Chen et al. (2006) geben. In dieser Maus wurde JG-spezifisch die $G_s\alpha$ Untereinheit des G-Proteins ausgeknockt. Die JG-Zelle exprimiert verschiedene Rezeptoren, die G-Protein gekoppelt sind. Unter anderem exprimieren sie den $\beta 1$ -Adrenorezeptor, den Prostaglandin E_2 -Rezeptor EP4 und den IP-Rezeptor. Schon länger wird angenommen, dass die Effekte der Salz-Diät über die Macula Densa (MD) gesteuert werden. Hierbei spielt die Cyclooxygenase 2 eine entscheidende Rolle (Harris et al., 2004). COX 2 generiert unter anderem Prostaglandin E_2 , welches dann über den EP4-Rezeptor in den JG-Zellen die cAMP Konzentration erhöht, und die folglich aktivierte PKA über die cAMP-Zielsequenzen des Reninpromotors die Renin Genexpression erhöht. Versuche mit veränderter Salz-Diät an der von Chen et al. generierten Maus wurden bislang noch nicht durchgeführt.

In meiner Maus konnten die Salz-Diäten die Transkription des LacZ Transgens im Gegensatz zur endogenen Reninexpression, nicht regulieren. Dies zeigt, dass die Enhancer-CRE und die CNRE Sequenzen essentiell für die Salz-abhängige Regulation des humanen Reningens in vivo sind.

Wie in Abbildung 3.30 gezeigt, führt ein 1 tägiger Wasserentzug der hRenMutLacZ Mäuse zu einer Aktivierung der Renin Genexpression um den Faktor 1,8. Ebenso wird deutlich, dass die Wasser-Deprivation auch einen Effekt auf den mutierten humanen Reninpromotor hat. Da trotz einer nur 1,8 fachen Erhöhung der endogenen Renin mRNA Abundanz auch ein Effekt auf die LacZ mRNA mit dem Faktor 1,7 zu sehen ist, kann davon ausgegangen werden, dass das Konstrukt fast genauso reguliert werden kann, wie das endogene Renin. Dies unterstreicht umso mehr meine Aussage bezüglich der Salzregulation, da Faktoren, die geringe Änderungen in der endogenen Renin Genexpression hervorrufen, diese auch auf das Transgen hRenMutLacZ ausüben und demnach die fehlende Regulation des Transgens durch Änderungen der Salz-Diät definitiv den Mutationen der beiden cAMP-Zielsequenzen Enhancer CRE und proximales CNRE zuzuschreiben sind. Treten geringe Unterschiede in der Regulation zwischen den beiden Promotoren auf, so liegt das an der

unterschiedlichen Primereffizienz bzw. an speziesspezifischen Promotoren, die verschieden stark auf die Transkriptionsfaktoren reagieren.

Da bei der Wasser-Deprivation beide Promotoren gleich reguliert wurden, muss dies unabhängig der beiden cAMP-Zielsequenzen Enhancer CRE und proximales Promotor CNRE geschehen. Eine Stimulation der Renin Gentranskription durch Wasser-Deprivation trotz Mutation im CNRE-Element konnte auch die Arbeitsgruppe Tanimoto et al. (2008) beobachten, was mein Ergebnis bestätigt.

5. Zusammenfassung

Ein funktionelles systemisches Renin-Angiotensin-System (RAS) ist für die Regulation des Blutdruckes und des Salz- und Wasserhaushaltes essentiell. Gravierende Änderungen in diesem System können zu verschiedenen kardiovaskulären Krankheiten, wie Bluthochdruck und Herzinsuffizienz und auch zu Nierenkrankheiten führen. Die Protease Renin stellt den limitierenden Faktor im RAS dar. Plasma-Renin wird in den juxtaglomerulären Zellen der Niere produziert. Renin wird auf der Ebene der Transkription als erstes reguliert, wobei verschiedene trans-wirkende Faktoren der JG-Zelle auf verschiedene cis-wirkende Elemente des Reninpromotors wirken. Es wird angenommen, dass der cAMP/PKA-Signalweg hierbei die wichtigste Kaskade darstellt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Proximal Promotor CNRE-Element und das distale Enhancer CRE-Element als cAMP-Zielsequenzen im humanen Reningen funktionell aktiv sind. Eine Mutation beider Elemente in einem 12,2 kb humanen Reninpromotor-Reportergenkonstrukt führt zum Verlust der cAMP-Induzierbarkeit der Transkriptionsaktivität *in vitro*. Es ist bekannt, dass der 12,2 kb humane Reninpromotor ausreichend für die Zell-spezifische Expression und Regulation des Renins *in vivo* ist. Deswegen wurde eine transgene Maus generiert, die den Enhancer CRE- und proximalen CNRE-mutierten 12,2 kb humanen Reninpromotor, mit dem Reporter gen LacZ, im Genom trägt. In diesen Mäusen wurde eine ko-Expression von LacZ und endogenem Renin in den JG-Zellen der Niere nachgewiesen. Dies zeigt, dass Enhancer CRE und proximales CNRE entbehrlich für die Zell-spezifische Expression des humanen Renings *in vivo* sind. Analyse der systemischen Regulation des Transgens in der Niere zeigt allerdings einen Verlust der Regulation durch β -Adrenorezeptor-Agonisten im Vergleich zum endogenen Reningen. Dies lässt eine Regulation der Renin Gentranskription durch den Signalweg β_1/β_2 -Adrenorezeptor/ G_s -Protein/cAMP/PKA annehmen. Regulation des Transgens durch Angiotensin II und Wasser-Deprivation entspricht der Regulation des endogenen Renins. Eine Behandlung der Mäuse mit Hochsalz- bzw. Niedrigsalz-Diät zeigt keinen Effekt auf die Regulation des Transgens im Vergleich zum endogenen Reningen. Diese Arbeit zeigt somit, dass die cAMP-Zielsequenzen des humanen Reninpromotors Enhancer CRE und CNRE essentiell für die Regulation der humanen Renin Gentranskription durch Änderungen in der Salzzufuhr sind.

6. Literaturverzeichnis

Abel KJ, and Gross KW (1988). Close physical linkage of the murine Ren-1 and Ren-2 loci. *Nucleic Acids Res* 16: 2111-2126.

Adams DJ, Head GA, Markus MA, Lovicu FJ, van der Weyden L, Kontgen F, Arends MJ, Thiru S, Mayorov DN, and Morris BJ (2006). Renin enhancer is critical for control of renin gene expression and cardiovascular function. *J Biol Chem* 281: 31753-31761.

Aldred GP, Fu P, Crawford RJ, and Fernley RT (1992). The sequence and tissue expression of ovine renin. *J Mol Endocrinol* 8: 3-11.

Andersen LJ, Andersen JL, Pump B, and Bie P (2002). Natriuresis induced by mild hypernatremia in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R1754-1761.

Bader M, Ganten D (2008). Update on tissue renin-angiotensin systems. *Journal of Molecular Medicine*; 6:615-21.

Barajas L (1979). Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am. J. Physiol.* 236, 240-246.

Basso N und Terragno NA (2001). History about the discovery of the renin-angiotensin system. *Hypertension*; 38:1246-1249.

Berger S, Bleich M, Schmid W, Greger R, and Schutz G (2000). Mineralocorticoid receptor knockout mice: lessons on Na⁺ metabolism. *Kidney Int* 57: 1295-1298.

Bing J, and Poulsen K (1979). Differences in renal and submaxillary renin release after stimulation with isoprenaline and noradrenaline. *Acta Physiol Scand* 105: 58-63.

- Björklund S, Almouzni G, Davidson I, Nightingale KP, Weiss K (1999).** Global transcription regulators of eukaryotes. *Cell*. 1999 Mar 19;96(6):759-67.
- Boivin V, Jahns R, Gambaryan S, Ness W, Boege F, and Lohse MJ (2001).** Immunofluorescent imaging of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat kidney. *Kidney Int* 59: 515-531.
- Borensztein P, Germain S, Fuchs S, Philippe J, 3157 Corvol P, and Pinet F (1994).** cis-regulatory elements and trans-acting factors directing basal and cAMP-stimulated human renin gene expression in chorionic cells. *Circ Res* 74: 764-773.
- Briggs JP, and Schnermann J (1986).** Macula densa control of renin secretion and glomerular vascular tone: evidence for common cellular mechanism. *Ren. Physiol.* 9:193-203.
- Burnham CE, Hawelu-Johnson CL, Frank BM, and Lynch KR (1987).** Molecular cloning of rat rennin cDNA and its gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 5605-5609.
- Burson JM, Aguilera G, Gross KW, and Sigmund CD (1994).** Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse. *Am J Physiol* 267: E260-267.
- Burt DW, Nakamura N, Kelley P, and Dzau VJ (1989).** Identification of negative and positive regulatory elements in the human renin gene. *J Biol Chem* 264: 7357-7362.
- Carey RM, McGrath HE, Pentz ES, Gomez RA, Barrett PQ (1997).** Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J Clin Invest* 100:1566-1574.
- Castrop H, Klar J, Wagner C, Hocherl K, and Kurtz A (2003).** General inhibition of renocortical cyclooxygenase-2 expression by the renin-angiotensin system. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F518-524.
- Castrop H, Schweda F, Mizel D, Huang Y, Briggs J, Kurtz A, and Schnermann J (2004).** Permissive role of nitric oxide in macula densa control of renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F848-F857.

Castrop H, Oppermann M, Weiss Y, Huang Y, Mizel D, Lu H, Germain S, Schweda F, Theilig F, Bachmann S, Briggs J, Kurtz A, Schnermann J (2006). Reporter gene recombination in juxtaglomerular granular and collecting duct cells by human renin promoter-Cre recombinase transgene. *Physiol Genomics*. 2006 Apr 13;25(2):277-85.

Chang CP, Brocchieri L, Shen WF, Largman C, and Cleary ML (1996). Pbx modulation of Hox homeodomain amino-terminal arms establishes different DNA-binding specificities across the Hox locus. *Mol Cell Biol* 16: 1734-1745.

Chen L, Kim SM, Oppermann M, Faulhaber-Walter R, Huang Y, Mizel D, Chen M, Lopez ML, Weinstein LS, Gomez RA, Briggs JP, and Schnermann J (2007). Regulation of renin in mice with Cre recombinase mediated deletion of G protein Gsalpha in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F27-37.

Clark AF, Sharp MGF, Morley SD, Fleming S, Peters J, Mullins JJ (1997). Renin-1 is essential for normal renal juxtaglomerular cell granulation and macula densa morphology. *J Biol Chem* 272:18185-18190.

Darnell JE, Jr., Kerr IM, and Stark GR (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264: 1415-1421.

Davis JO, and Freeman RH (1976). Mechanisms regulating renin release. *Physiol Rev* 56: 1-56.

Della Bruna R, Pinet F, Corvol P, and Kurtz A (1995). Opposite regulation of renin gene expression by cyclic AMP and calcium in isolated mouse juxtaglomerular cells. *Kidney Int* 47: 1266-1273.

Dickinson DP, Gross KW, Piccini N, and Wilson CM (1984). Evolution and variation of renin genes in mice. *Genetics* 108: 651-667.

Finke R, Gross R, Hackenthal E, Huber J, Kirchheim HR (1983). Threshold pressure for the pressure-dependent renin release in the autoregulating kidney of conscious dogs. *Pflügers Arch.* 1983 Oct;399(2):102-10.

Fray JCS, and Lush DJ (1984). Stretchreceptor hypothesis for renin secretion: the role of calcium. *J. Hypertens* 2: 19-23.

Friis UG, Stubbe J, Uhrenholt TR, Svenningsen P, Nusing RM, 3524 Skott O, and Jensen BL (2005). Prostaglandin E2 EP2 and EP4 receptor activation mediates cAMP-dependent hyperpolarization and exocytosis of renin in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F989-997.

Fuchs S, Germain S, Philippe J, Corvol P, Pinet F (2002). Expression of renin in large arteries outside the kidney revealed by human renin promoter/LacZ transgenic mouse. *Am J Pathol.* 2002 Aug;161(2):717-25.

Fuchs S, Philippe J, Corvol P, and Pinet F (2003). Implication of Ref-1 in the repression of renin gene transcription by intracellular calcium. *J Hypertens* 21: 327-335.

Fukamizu A, Nishi K, Cho T, Saitoh M, Nakayama K, Ohkubo H, Nakanishi S, and Murakami K (1988). Structure of the rat renin gene. *J Mol Biol* 201: 443-450.

Germain S, Konoshita T, Fuchs S, Philippe J, Corvol P, and Pinet F (1997). Regulation of human rennin gene transcription by cAMP. *Clin Exp Hypertens* 19: 543-550, 1997.

Germain S, Konoshita T, Philippe J, Corvol P, and Pinet F (1996). Transcriptional induction of the human renin gene by cyclic AMP requires cyclic AMP response element-binding protein (CREB) and a factor binding a pituitary-specific trans-acting factor (Pit-1) motif. *Biochem J* 316 (Pt 1): 107-113.

Glenn ST, Jones CA, Pan L, Gross KW (2008). In vivo analysis of key elements within the renin regulatory region. *Physiol Genomics.* 2008 Nov 12;35(3):243-53.

Golin R, Pieruzzi F, Munforti C, Busca G, Di Blasio A, and Zanchetti A (2001). Role of the renal nerves in the control of renin synthesis during different sodium intakes in the rat. *J Hypertens* 19: 1271-1277.

Goormaghtigh N (1937). L'appareil neuromyo-arteriel juxtaglomerulaire du renin; ses reactions en pathologie et ses rapports avec le tube urinifere. *C R Soc Biol* 124 :293-296.

Hackenthal E, Aktories K, Jakobs KH, Lang RE (1987). Neuropeptide Y inhibits renin release by a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Am J Physiol* 252(3 Pt 2): F543-50.

Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R (1990). Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev*; 70:1067- 1116.

Hansen PB, Yang T, Huang Y, Mizel D, Briggs J, and Schnermann J (2004). Plasma renin in mice with one or two renin genes. *Acta Physiol Scand* 181: 431-437.

Hardman JA, Hort YJ, Catanzaro DF, Tellam JT, Baxter JD, Morris BJ, and Shine J (1984). Primary structure of the human renin gene. *DNA* 3: 457-468.

Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD (1994). Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 94(6): 2504-10.

Harris RC (2003). Interactions between COX-2 and the renin-angiotensin system in the kidney. *Acta Physiol Scand* 177(4): 423-7.

Harris RC, Zhang MZ, Cheng HF (2004). Cyclooxygenase-2 and the renal renin-angiotensin system. *Acta Physiol Scand*. 2004 Aug;181(4):543-7.

Hees H, Sinowatz F (2000). Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopische Anatomie. Deutscher Ärzte-Verlag Köln, 3. Auflage, S285-298.

Hesse IF, and Johns EJ (1985). The role of alpha-adrenoceptors in the regulation of renal tubular sodium reabsorption and renin secretion in the rabbit. *Br J Pharmacol* 84: 715-724.

Hobart PM, Fogliano M, O'Connor BA, Schaefer IM, and Chirgwin JM (1984). Human renin gene: structure and sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 5026-5030.

Höcherl K, Kees F, Kramer BK, and Kurtz A (2004). Cyclosporine A attenuates the natriuretic action of loop diuretics by inhibition of renal COX-2 expression. *Kidney Int* 65: 2071-2080.

Holm I, Ollo R, Panthier JJ, and Rougeon F (1984). Evolution of aspartyl proteases by gene duplication: the mouse renin gene is organized in two homologous clusters of four exons. *Embo J* 3: 557-562.

Holmer S, Eckardt KU, LeHir M, Schricker K, Riegger G, and Kurtz A (1993). Influence of dietary NaCl intake on renin gene expression in the kidneys and adrenal glands of rats. *Pflugers Arch* 425: 62-67.

Holmer S, Rinne B, Eckardt KU, Le Hir M, Schricker K, Kaissling B, Riegger G, and Kurtz A (1994). Role of renal nerves for the expression of renin in adult rat kidney. *Am J Physiol* 266: F738-745.

Holmer SR, Kaissling B, Putnik K, Pfeifer M, Kramer BK, Riegger GA, Kurtz A (1997). Beta-adrenergic stimulation of renin expression in vivo. *J Hypertens* 15:1471-1479.

Horiuchi M, Nakamura N, Tang SS, Barrett G, and Dzau VJ (1991). Molecular mechanism of tissue specific regulation of mouse renin gene expression by cAMP. Identification of an inhibitory protein that binds nuclear transcriptional factor. *J Biol Chem* 266: 16247-16254.

Horiuchi M, Pratt RE, Nakamura N, and Dzau VJ (1993). Distinct nuclear proteins competing for an overlapping sequence of cyclic adenosine monophosphate and negative regulatory elements regulate tissue specific mouse renin gene expression. *J Clin Invest* 92: 1805-1811.

Inada A, Nienaber C, Bonner-Weir S (2006). Endogenous beta-galactosidase expression in murine pancreatic islets. *Diabetologia*. 2006 May;49(5):1120-2.

Itani HA, Liu X, Pratt JH, and Sigmund CD (2007). Functional characterization of polymorphisms in the kidney enhancer of the human renin gene. *Endocrinology* 148: 1424-1430.

Jensen BL, Schmid C, and Kurtz A (1996). Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol* 271: F659-669.

Jensen BL, Kramer BK, Kurtz A (1997). Adrenomedullin stimulates renin release and renin mRNA in mouse juxtaglomerular granular cells. *Hypertension* 29(5): 1148-55.

Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO (2002). *Histologie*. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 5. Auflage, S. 329.

Keeton TK, and Campbell WB (1980). The pharmacologic alteration of renin release. *Pharmacol Rev* 32: 81-227.

Kennelly PJ, and Krebs EG (1991). Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 266: 15555-15558.

Kim SM, Chen L, Faulhaber-Walter R, Oppermann M, Huang Y, Mizel D, Briggs JP, and Schnermann J (2007). Regulation of renin secretion and expression in mice deficient in beta1- and beta2-adrenergic receptors. *Hypertension* 50: 103-109.

Klar J, Sandner P, Müller MW, and Kurtz A (2002). Cyclic AMP stimulates renin gene transcription in juxtaglomerular cells. *Pflugers Arch* 444: 335-344.

Klar J, Vitzthum H, and Kurtz A (2004). Aldosterone enhances renin gene expression in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F349-355.

Klar J, Sigl M, Obermayer B, Schweda F, Krämer BK, Kurtz A (2005). Calcium inhibits renin gene expression by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Hypertension* 46(6):1340-6.

Kurtz A, Pfeilschifter J, Hutter A, Buhrle C, Nobiling R, Taugner R, Hackenthal E, and Bauer C (1986). Role of protein kinase C in inhibition of renin release caused by vasoconstrictors. *Am J Physiol* 250: C563-571.

Kurtz A, Muff R, Born W, Lundberg JM, Milberg BJ, Gnädinger MP (1988). Calcitonin gene related peptide is stimulator of renin secretion. *J Clin Invest* 82: 538-543.

Kurtz A (1989). Cellular control of renin secretion. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 113: 1-40.

Kurtz A (1997). Membrane and secretory properties of renal juxtaglomerular granular cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24(7): 536-40.

Kurtz A, and Wagner C (1999). Cellular control of renin secretion. *J Exp Biol* 202: 219-225.

Lalli E, and Sassone-Corsi P (1994). Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *J Biol Chem* 269: 17359-17362.

Lang JA, Yang G, Kern JA, Sigmund CD (1995). Endogenous human renin expression and promoter activity in CALU-6, a pulmonary carcinoma cell line. *Hypertension*. 1995 Apr;25(4 Pt 2):704-10.

Lang JA, Ying LH, Morris BJ, Sigmund CD (1996). Transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human renin gene expression in Calu-6 cells. *Am J Physiol*. 1996 Jul;271(1 Pt 2):F94-100.

Le Fevre ME, Guild SJ, Ramchandra R, Barrett CJ, and Malpas SC (2003). Role of angiotensin II in the neural control of renal function. *Hypertension* 41: 583-591.

Liu X, Huang X, and Sigmund CD (2003). Identification of a nuclear orphan receptor (Ear2) as a negative regulator of renin gene transcription. *Circ Res* 92: 1033-1040.

Machura K, Steppan D, Neubauer B, Alenina N, Coffman TM, Facemire CS, Hilgers KF, Eckardt KU, Wagner C, Kurtz A (2009). Developmental renin expression in mice with a defective renin-angiotensin system. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009 Nov;297(5):F1371-80.

Makhanova N, Lee G, Takahashi N, Sequeira Lopez ML, Gomez RA, Kim HS, and Smithies O (2006). Kidney function in mice lacking aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F61-69.

Markus MA, Goy C, Adams DJ, Lovicu FJ, and Morris BJ (2007). Renin enhancer is crucial for full response in Renin expression to an in vivo stimulus. *Hypertension* 50: 933-938.

Meneton P, Ichikawa I, Inagami T, and Schnermann J (2000). Renal physiology of the mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F339-351.

Moncada S (1983). Biology and therapeutic potential of prostacyclin. *Stroke* 14: 157-168.

Montminy M (1997). Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 66: 807-822.

Morello F, de Boer RA, Steffensen KR, Gnechi M, Chisholm JW, Boomsma F, Anderson LM, Lawn RM, Gustafsson JA, Lopez-Illasaca M, Pratt RE, and Dzau VJ (2005). Liver X receptors alpha and beta regulate renin expression in vivo. *J Clin Invest* 115: 1913-1922.

Morris BJ (1992) Molecular biology of renin I: gene and protein structure, synthesis and processing. *J Hypertens* 10:209-214.

Morris BJ (1996). Hypothesis: an angiotensin converting enzyme genotype, present in one in three caucasians, is associated with increased mortality rate. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 23(1): 1-10.

Mundel P, Bachmann S, Bader M, Fischer A, Kummer W, Mayer B, Kriz W (1992). Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells. *Kidney Int* 42(4): 1017-1019.

Müller MW, Todorov V, Krämer BK, and Kurtz A (2002). Angiotensin II inhibits renin gene transcription via the protein kinase C pathway. *Pflügers Arch* 444: 499-505.

Nafz B, Berthold H, et al. (1997). Flow versus pressure in the control of renin release in conscious dogs. *Am J Physiol* 273(2 Pt 2): F200-5

Naftilan AJ, and Oparil S (1978). Inhibition of renin release from rat kidney slices by the angiotensins. *Am J Physiol* 235: F62-68.

Nakamura N, Burt DW, Paul M, and Dzau VJ (1989). Negative control elements and cAMP responsive sequences in the tissue-specific expression of mouse renin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 56-59.

Oliverio MI, Madsen K, Best CF, Ito M, Maeda N, Smithies O, and Coffman TM (1998). Renal growth and development in mice lacking AT1A receptors for angiotensin II. *Am J Physiol* 274: F43-50.

Pan L, Black TA, Shi Q, Jones CA, Petrovic N, Loudon J, Kane C, Sigmund CD, and Gross KW (2001). Critical roles of a cyclic AMP responsive element and an E-box in regulation of mouse renin gene expression. *J Biol Chem* 276: 45530-45538.

Pan L, Xie Y, Black TA, Jones CA, Pruitt SC, and Gross KW (2001). An Abd-B class HOX.PBX recognition sequence is required for expression from the mouse Ren-1c gene. *J Biol Chem* 276: 32489-32494.

Pan L, Glenn ST, Jones CA, Gronostajski RM, and Gross KW (2003). Regulation of renin enhancer activity by nuclear factor I and Sp1/Sp3. *Biochim Biophys Acta* 1625: 280-290.

Pan L, Jones CA, Glenn ST, and Gross KW (2004). Identification of a novel region in the proximal promoter of the mouse renin gene critical for expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F1107-1115.

Pan L, Wang Y, Jones CA, Glenn ST, Baumann H, Gross KW (2004). Enhancer-dependent inhibition of mouse renin transcription by inflammatory cytokines. *Am. J. Physiol.* 288, F117-F124.

Pan L, Glenn ST, Jones CA, and Gross KW (2005). Activation of the rat renin promoter by HOXD10. PBX1b. PREP1, Ets-1, and the intracellular domain of notch. *J Biol Chem* 280: 20860-20866.

Panthier JJ, Foote S, Chambraud B, Strosberg AD, Corvol P, and Rougeon F (1982). Complete amino acid sequence and maturation of the mouse submaxillary gland renin precursor. *Nature* 298: 90-92.

Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 86(3): 747-803.

Petrovic N, Black TA, Fabian JR, Kane C, Jones CA, Loudon JA, Abonia JP, Sigmund CD, and Gross KW (1996). Role of proximal promoter elements in regulation of renin gene transcription. *J Biol Chem* 271:22499-22505.

Petrovic N, Kane CM, Sigmund CD, Gross KW (1997). Downregulation of renin gene expression by interleukin-1. *Hypertension* 30(2 Pt 1): 230-5.

Pietri L, Bloch-Faure M et al. (2002). Altered renin synthesis and secretion in the kidneys of heterozygous mice with a null mutation in the TGF-beta(2) gene. *Exp Nephrol* 10(5-6): 374-82.

Pfeilschifter J, Kurtz A, Bauer C (1985). Inhibition of renin secretion by platelet activating factor (acetylglyceryl ether phosphorylcholine) in cultured rat renal juxtaglomerular cells. *Biochem Biophys Res Commun* 127(3): 903-10.

Ritthaler T, Della Bruna R, Kramer BK, and Kurtz A (1996). Endothelins inhibit cyclic-AMP induced renin gene expression in cultured mouse juxtaglomerular cells. *Kidney Int* 50: 108-115.

Ritthaler T, Scholz H, Ackermann M, Riegger G, Kurtz A, and Kramer BK (1995). Effects of endothelins on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol* 268: F39-45.

Romeis B (1989). Romeis mikroskopische Technik. *Urban & Schwarzenberg, München*, 17. Auflage, S.256-259, 1989.

Ryan MJ, Black TA, Gross KW, Hajduczuk G (2000). Cyclic mechanical distension regulates renin gene transcription in As4.1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279 (4): E830- E837.

Schnermann J (2001). Cyclooxygenase-2 and macula densa control of renin secretion. *Nephrol Dial Transplant* 16(9): 1735-8.

Scholz H, Vogel U, Kurtz A (1993). Interrelation between baroreceptor and macula densa mechanisms in the control of renin secretion. *J Physiol*. 469: 511-24.

Scholz H, Hamann M, Götz KH, and Kurtz A (1994). Role of calcium ions in the pressure control of renin secretion from the kidneys. *Pflugers Arch* 428: 173-178.

Scholz H, Krämer BK, Hamann M, Kurtz A (1995). Effects of endothelins on renin secretion from rat kidneys. *Acta Physiol Scand* 155: 173-182.

Schunkert H, Ingelfinger JR, Jacob H, Jackson B, Bouyounes B, and Dzau VJ (1992). Reciprocal feedback regulation of kidney angiotensinogen and renin mRNA expressions by angiotensin II. *Am J Physiol* 263: E863-869.

Schweda F, Kammerl M, Wagner C, Krämer BK, and Kurtz A (2004). Upregulation of macula densa cyclooxygenase-2 expression is not dependent on glomerular filtration. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F95-F101.

Schweda F, Friis U, Wagner C, Skott O, Kurtz A (2007). Renin release. *Physiologie*(Bethesda) 22: 310-9.

Sequeira Lopez ML, Pentz ES Robert B, Abrahamson DR, Gomez RA (2001). Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 281(2):F345-56.

Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Nomasa T, Smithies O, Gomez RA (2004). Renin cells are precursors for multiple cell types that switch to the renin phenotype when homeostasis is threatened. *Dev Cell* 6(5): 719-728.

Shi Q, Black TA, Gross KW, and Sigmund CD (1999). Species-specific differences in positive and negative regulatory elements in the renin gene enhancer. *Circ Res* 85: 479-488.

Shi Q, Gross KW, and Sigmund CD (2001). NF-Y antagonizes renin enhancer function by blocking stimulatory transcription factors. *Hypertension* 38: 332-336.

Shi Q, Gross KW, and Sigmund CD (2001). Retinoic acid-mediated activation of the mouse renin enhancer. *J Biol Chem* 276: 3597-3603.

Sigmund CD, Okuyama K, Ingelfinger J, Jones CA, Mullins JJ, Kane C, Kim U, Wu CZ, Kenny (1990). containing a renin-promoter viral oncogene fusion construct. *J Biol Chem* 265: 19916-19922.

Sinn PL, Davis DR, Sigmund CD (1999). Highly regulated cell type-restricted expression of human renin in mice containing 140- or 160-kilobase pair P1 phage artificial chromosome transgenes. *J Biol Chem*. 1999 Dec 10;274(50):35785-93.

Skinner SL, McCubbin JW, and Page IH (1964). Renal baroreceptor control of acute renin release in normotensive, nephrogenic and neurogenic hypertensive dogs. *Circ Res* 15: 522-531.

Skott O (1986). Episodic release of renin from single isolated superfused rat afferent arterioles. *Pflügers Arch* 407, 41-45.

Smith DL, Morris BJ, Do YS, Law RE, Shaw KJ, Hseuh WA (1994). Identification of cyclic AMP response element in the human renin gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Apr 15;200(1):320-9.

Spat A, and Hunyady L(2004). Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol Rev* 84: 489-539.

Steege A, Fahling M, Paliege A, Bondke A, Kirschner KM, Martinka P, Kaps C, Patzak A, Persson PB, Thiele BJ, Scholz H, and Mrowka R (2008). Wilms' tumor protein (-KTS) modulates renin gene transcription. *Kidney Int.*

Sugaya T, Nishimatsu S, Tanimoto K, Takimoto E, Yamagishi T, Imamura K, Goto S, Imaizumi K, Hisada Y, Otsuka A, et al (1995). Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice with hypotension and hyperreninemia. *J Biol Chem.* 1995 Aug 11;270(32):18719-22.

Sun J, Oddoux C, Gilbert MT, Yan Y, Lazarus A, Campbell WG, Jr., and Catanzaro DF (1994). Pituitary-specific transcription factor (Pit-1) binding site in the human renin gene 5'-flanking DNA stimulates promoter activity in placental cell primary cultures and pituitary lactosomatotropic cell lines. *Circ Res* 75: 624-629.

Sun J, Oddoux C, Lazarus A, Gilbert MT, and Catanzaro DF (1993). Promoter activity of human renin 5'-flanking DNA sequences is activated by the pituitary-specific transcription factor Pit-1. *J Biol Chem* 268: 1505-1508.

Tamura K, Umemura S, et al (1995). Recent advances in the study of renin and angiotensin genes: from molecules to the whole body. *Hypertens Res* 18(1): 7-18.

Tamura K, Chen YE, Horiuchi M, Chen Q, Daviet L, Yang Z, Lopez-Ilasaca M, Mu H, Pratt RE, and Dzau VJ (2000). LXRalpha functions as a cAMP-responsive transcriptional regulator of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8513-8518.

Tamura K, Chen YE, Tanaka Y, Sakai M, Tsurumi Y, Koide Y, Kihara M, Pratt RE, Horiuchi M, Umemura S, and Dzau VJ (2004). Nuclear receptor LXRalpha is involved in cAMP-mediated human renin gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 224: 11-20.

Tanimoto K, Sugiura A, Kanafusa S, Saito T, Masui N, Yanai K, and Fukamizu A (2008). A single nucleotide mutation in the mouse renin promoter disrupts blood pressure regulation. *J Clin Invest* 118: 1006-1016.

Taugner R, Buhrle CP, Hackenthal E, Mannek E, and Nobiling R (1984). Morphology of the juxtaglomerular apparatus. *Contr. Nephrol* 43: 76-101.

Tkacs NC, Kim M, Denzon M, Hargrave B, and Ganong WF (1990). Pharmacological evidence for in rats. *Life Sci* 47: 2317-2322.

Todorov VT, Müller M, Schweda F, Kurtz A (2002). Tumor necrosis factor- α inhibits renin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283(5): R1046-51.

Todorov VT, Völkl S, Müller M, Bohla A, Klar J, Kunz-Schughart LA, Hehlhans T, Kurtz A (2004). Tumor necrosis factor- α activates NF κ B to inhibit renin transcription by targeting cAMP-responsive element. *J Biol Chem* 279(2): 1458-67.

Todorov VT, Völkl S, Friedrich J, Kunz-Schughart LA, Hehlhans T, Vermeulen L, Haegeman G, Schmitz ML, Kurtz A (2005). Role of CREB1 and NF κ B-p65 in the down-regulation of renin gene expression by tumor necrosis factor α . *J. Biol. Chem.* 280, 24356-24362.

Todorov VT, Desch M, Schmitt-Nilsson N, Todorova A, and Kurtz A (2007). Peroxisome proliferator activated receptor- γ is involved in the control of renin gene expression. *Hypertension* 50: 939-944.

Todorov VT, Desch M, Schubert T, and Kurtz A (2008). The Pal3 promoter sequence is critical for the regulation of human renin gene transcription by PPAR{gamma}. *Endocrinology*.

Vander AJ (1967). Control of renin release. *Physiol Rev.* 47(3): 359-82.

Vandongen R, Peart WS, and Boyd GW (1974). Effect of angiotensin II and its nonpressor derivatives on renin secretion. *Am J Physiol* 226: 277-282.

Wagner C, and Kurtz A (1998). Regulation of renal renin release. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7: 437-441.

Wagner C, Hinder M, Krämer BK, Kurtz A. (1999). Role of renal nerves in the stimulation of the renin system by reduced renal arterial pressure. *Hypertension* 34(5):1101-5.

Yan Y, Jones CA, Sigmund CD, Gross KW, and Catanzaro DF (1997). Conserved enhancer elements in human and mouse renin genes have different transcriptional effects in As4.1 cells. *Circ Res* 81: 558-566.

Ying L, Morris BJ, and Sigmund CD (1997). Transactivation of the human renin promoter by the cyclic AMP/protein kinase A pathway is mediated by both cAMP-responsive element binding protein-1 (CREB)-dependent and CREB-independent mechanisms in Calu-6 cells. *J Biol Chem* 272: 2412-2420.

Zhang MZ, Wang SW, Cheng H, Zhang Y, McKanna JA, and Harris RC (2003). Regulation of renal cortical cyclooxygenase-2 in young rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F881-888.

Zhou X, Davis DR, and Sigmund CD (2006). The human renin kidney enhancer is required to maintain base line renin expression but is dispensable for tissue-specific, cell-specific, and regulated expression. *J Biol Chem* 281: 35296-35304.

7. Anhang

7.1 Publikationen

Hautmann M, Friis UG, Desch M, Todorov V, Castrop H, Segerer F, Otto C, Schütz G, Schweda F (2007). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates renin secretion via activation of PAC1 receptors. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Apr;18(4):1150-6.

Todorov VT, Desch M, Schmitt-Nilson N, Todorova A, Kurtz A (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is involved in the control of renin gene expression. *Hypertension*. 2007 Nov;50(5):939-44.

Todorov VT, Desch M, Schubert T, Kurtz A (2008). The Pal3 promoter sequence is critical for the regulation of human renin gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Endocrinology*. 2008 Sep;149(9):4647-57.

Desch M, Schreiber A, Schweda F, Madsen K, Friis UG, Weatherford ET, Sigmund CD, Sequeira Lopez ML, Gomez RA, Todorov VT (2010). Increased Renin Production in Mice With Deletion of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ in Juxtaglomerular Cells. *Hypertension*. 2010 Jan 11.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Die Signalkaskade des RAS	8
Abbildung 1.2: Schematische Übersicht eines Nephrons	9
Abbildung 1.3: Schematische und immunhistologische Darstellung eines Glomerulums	10
Abbildung 1.4: Differenzierung der JG-Zellen.	11
Abbildung 1.5: Schematische Übersicht der Prozessierung des Renins	12
Abbildung 1.6: cAMP/PKA Signalkaskade des Renings	20
Abbildung 3.1: Konstrukt hRenMin	65
Abbildung 3.2: hRenMin Promotor-Aktivität in Calu-6-Zellen	65
Abbildung 3.3: hRenMin Promotor-Aktivität in Calu-6-Zellen	66
Abbildung 3.4: Konstrukt proxCREhRenMin	67
Abbildung 3.5: proxCREhRenMin Promotor-Aktivität in Calu-6-Zellen	68
Abbildung 3.6: Konstrukt pCRE-Luc	69
Abbildung 3.7: pCRE-Luc Promotor-Aktivität in Calu-6-Zellen	69
Abbildung 3.8: Konstrukt consCREhRenMin	70
Abbildung 3.9: consCREhRenMin Promotor-Aktivität in Calu-6-Zellen	71
Abbildung 3.10: Konstrukt enhCREhRenMin	72
Abbildung 3.11: enhCREhRenMin Promotor-Aktivität in Calu-6-Zellen	73
Abbildung 3.12: Konstrukt hRenLacZ	74
Abbildung 3.13: Konstrukt hRenMutLacZ	75
Abbildung 3.14: β -Galaktosidase-Assay in Calu-6-Zellen	76
Abbildung 3.15: Beispiel einer Genotypisierung: hRenMutLacZ	78
Abbildung 3.16: X-Gal Färbung eines Nierenschnittes der hRenMutLacZ-Maus	79
Abbildung 3.17: Färbung von hRenMutLacZ-Nierenschnitten	81
Abbildung 3.18: 3D-Rekonstruktion eines Teils einer hRenMutLacZ-Niere	83
Abbildung 3.19: X-Gal Färbung eines Nierenschnittes der hRenMutLacZ-Maus	85
Abbildung 3.20: X-Gal-Färbung von Nieren nicht-transgener Mäuse	86
Abbildung 3.21: X-Gal-Färbung extrarenaler Organe	88-91
Abbildung 3.22: Real-Time-PCR nach Isoproterenol-Applikation	93
Abbildung 3.23: Real-Time-PCR nach Enalapril-Applikation	94
Abbildung 3.24: Färbung von Nierenschnitten	95
Abbildung 3.25: X-Gal Färbung zweier Nierenschnitte der hRenMutLacZ-Maus	97

Abbildung 3.26: Prozentualer Anteil an X-Gal gefärbten Glomeruli pro Schnitt	98
Abbildung 3.27: Beispiel einer Genotypisierung: hRenMutLacZ AT _{1a} ^{-/-}	99
Abbildung 3.28: Färbung von Nierenschnitten	100
Abbildung 3.29: X-Gal Färbung zweier Nierenschnitte	102
Abbildung 3.30: 3D-Rekonstruktion eines Teils einer hRenMutLacZ AT _{1a} ^{-/-} -Niere	103
Abbildung 3.31: Real-Time-PCR nach unterschiedlichen Salzdiäten	105
Abbildung 3.32: Real-Time-PCR nach Wasser-Deprivation	106
Abbildung 4.1: Regulation der Renin Gentranskription	108

7.3 Abkürzungsverzeichnis

Chemische und biologische Größen und Einheiten

Da	Dalton
bp	Basenpaare
kb	kiloBasenpaare
M	molar
MG	Molekulargewicht
pH	pH-Wert (<i>potentia Hydroxii</i>)
U	enzymatische Einheit (<i>Unit</i>)

Physikalische Größen und Einheiten

°C	Grad Celsius
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde(n)
l	Liter
min	Minute(n)
OD	optische Dichte
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde(n)
V	Volt
V	Volumen

Dezimale Vielfache und Teile von Einheiten

k	kilo (1×10^3)
m	milli (1×10^{-3})
μ	micro (1×10^{-6})
n	nano (1×10^{-9})
p	pico (1×10^{-12})

Sonstige

%	Prozent
Abb.	Abbildung
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Varianzanalyse
AT ₁	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
AT ₂	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>copy deoxyribonucleic acid</i>
CNRE	<i>cAMP and overlapping negative regulatory element</i>
Cre	zyklische Rekombinase
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>CRE binding protein</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
EtOH	Ethanol
HS	Pferdeserum (<i>horse serum</i>)
Lsg	Lösung
Ig	Immunglobulin
JG	juxtaglomerulär
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)

PFA	Paraformaldehyd
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
Taq	thermostabile DNA-Polymerase aus <i>thermos aquaticus</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TRIS	Tris-(hydroxy-methyl-)aminomethan
üN	über Nacht
z.B.	zum Beispiel

7.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die während der letzten Jahre zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz für die Vergabe des Themas und für die Bereitstellung der benötigten Arbeitsmittel und Geräte. Sein großes Interesse und sein Engagement trugen wesentlich zum Gelingen dieser Dissertation bei.

Für die fachliche Unterstützung, die kompetente Betreuung und für seine fortwährende Hilfsbereitschaft möchte ich mich ganz herzlich bei PD Dr. Dr. Vladimir T. Todorov bedanken. Danke auch für das Korrekturlesen dieses Manuskripts und dass ich jederzeit mit Fragen und Problemen zu dir kommen konnte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Birgül Kurt für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für die stets aufmunternden Worte und amüsanten Diskussionen im Büro.

Besonderer Dank gilt auch Meli für die Hilfe bei den 3D-Rekonstruktionen und den damit verbundenen geopferten Samstagabend.

Danken möchte ich auch Andrea, Elisabeth, Kathi, Käthe, Meli, Ramona, Sabine, Sandra, Vroni, Björn und Dominik für das perfekte Arbeitsklima und den gemeinsamen Stunden im Kaffeeraum.

Bedanken möchte ich mich auch beim ersten Bachelor Marc und den zahlreichen Praktikantinnen und Praktikanten und den daraus geformten Diplomanden (Nina, Tom, Andrea, Sabine und Sandra), die auch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich möchte mich auch noch bei den Ehemaligen des Lehrstuhls für die gemeinsame Zeit bedanken. Dank an Biggi, Jessica und Susi.

Bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts und des zweiten Stocks möchte ich für das angenehme Arbeitsklima, für Freundlichkeit und kollegiale Atmosphäre danken.

Nochmaliger Dank gilt Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz für die Bereitstellung des Kickers und somit allen, die mir einen Kaffee spendieren durften ☺

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern Martha und Rudolf für ihre kontinuierliche Unterstützung, und dass sie mir bei allen Entscheidungen stets den Rücken frei gehalten haben. Vielen Dank schließlich auch an meine Schwester Christiane meinen Bruder Matthias und meine Freunde, die mir stets freundschaftlich zur Seite standen.

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten oder Konzepte sind unter der Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 19.01.10

Desch Michael